

Aus dem Institut für Pathologie im Klinikum Augsburg,  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Chefarzt: Prof. Dr. med. Bruno Märkl

**Prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und  
uPA/PAI-1 beim Mammakarzinom**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Martin Franz Kazik  
aus Wertingen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Bruno Märkl

Mitberichterstatter:

PD Dr. Thomas Grünewald

Prof. Dr. Nadia Harbeck

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung:

17.10.2019

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
1.1 DAS MAMMAKARZINOM .....	9
1.1.1 Epidemiologie.....	9
1.1.2 Klassifizierung des Mammakarzinoms.....	10
1.1.2.1 Pathologische Grundlagen .....	10
1.1.2.2 Stadieneinteilung .....	10
1.1.2.3 Grading .....	11
1.1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren.....	12
1.1.3.1 Prädiktive Faktoren.....	12
1.1.3.1.1 Östrogen-/ Progesteronrezeptorstatus.....	12
1.1.3.1.2 HER2/neu.....	13
1.1.3.1.3 Ki-67 .....	13
1.1.3.1.4 uPA/PAI-1 .....	14
1.1.3.2 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark .....	16
1.1.4 Therapie .....	17
1.1.4.1 Operative Strategien.....	17
1.1.4.2 Systemische Chemotherapie.....	18
1.1.4.3 Hormontherapie .....	18
1.1.4.4 Anti-HER2-Therapie (Trastuzumab).....	19
1.1.4.5 Adjuvante Radiotherapie .....	19
1.2 TUMORBIOLOGIE DER MALIGNEN TRANSFORMATION, TUMORINVASION UND METASTASIERUNG .....	20
1.3 ZIEL DIESER ARBEIT .....	23
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV .....	25
2.2 NACHBEOBACHTUNG UND FOLLOW-UP .....	25
2.3 BERATUNGSKOMMISSION FÜR KLINISCHE STUDIEN .....	26
2.4 uPA/PAI-1 UNTERSUCHUNGSVERFAHREN .....	26
2.4.1 Gewebeaufbereitung.....	28
2.4.2 uPA/PAI-1 Bestimmung.....	29
2.4.2.1 Prinzip der uPA/PAI-1 Bestimmung.....	29
2.4.2.2 Durchführung des Assays.....	30
2.4.3 Gesamtproteinkonzentration .....	31
2.5 KNOCHENMARKASPIRATION .....	32
2.6 BESTIMMUNG CYTOKERATIN-POSITIVER ZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK.....	33
2.6.1 Aufbereitung des Knochenmarks und Herstellung eines Cytospins.....	34
2.6.2 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin-positiven Zellen.....	35
2.7 STATISTIK .....	36
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
3.1 DATENÜBERBLICK.....	37
3.2 UNTERSUCHUNGEN AM GESAMTKOLLEKTIV .....	39
3.2.1 Verteilung von dCK+ Zellen in Abhängigkeit von uPA/PAI-1 .....	39
3.2.2 Kaplan-Meier für uPA/PAI-1 (Overall Survival) .....	40
3.2.3 Kaplan-Meier für dCK+ Zellen (Overall Survival) .....	41
3.3 UNTERSUCHUNGEN AM KOLLEKTIV OHNE CHEMOTHERAPIE (UNABHÄNGIG VOM TUMORSTADIUM) .....	42
3.3.1 Kaplan-Meier für uPA/PAI-1 (Overall Survival) .....	42

3.3.2 Kaplan-Meier für dCK+ Zellen (Overall Survival) .....	43
3.4 UNTERSUCHUNGEN AM N0-KOLLEKTIV (UNABHÄNGIG VOM CHEMOTHERAPIESTATUS)..	44
3.4.1 Kaplan-Meier für uPA/PAI-1 (Overall Survival) .....	44
3.4.2 Kaplan-Meier für dCK+ Zellen (Overall Survival) .....	45
3.5 UNTERSUCHUNGEN AM N0-KOLLEKTIV OHNE CHEMOTHERAPIE.....	46
3.5.1 Korrelation uPA zum Gesamtüberleben (Overall Survival) .....	46
3.5.2 Kaplan-Meier für dCK+ Zellen (Overall Survival) .....	47
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
4.1 METHODISCHE ASPEKTE .....	49
4.1.1 Bestimmung Cytokeratin-positiver Zellen.....	49
4.1.2 Bestimmung uPA/PAI-1.....	51
4.2 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN UPA UND CYTOKERATIN-POSITIVEN ZELLEN.....	53
4.3 FEHLENDER STATISTISCHER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN PAI-1 UND CYTOKERATIN-POSITIVEN ZELLEN.....	54
4.4 EFFEKTE VON UPA/PAI-1 UND CYTOKERATIN-POSITIVEN ZELLEN AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN (OVERALL SURVIVAL).....	54
4.5 N0-PATIENTENKOLLEKTIV .....	56
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>58</b>
<b>6. DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>60</b>
<b>7. TABELLEN UND ABBILDUNGEN .....</b>	<b>61</b>
7.1 TABELLEN .....	61
7.2 ABBILDUNGEN .....	61
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>63</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

0.5 M	0,5-molare Lösung
A.	Arteria
AGO	Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie
ALND	Axilläre Lymphknotendisektion
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
ASCO	American Society of Clinical Oncology
$\alpha_v$ integrin	Integrin alpha V
BCA	Bicinchoninic acid
BET	Brusterhaltende Therapie
BKF	Beratungskommission für klinische Forschung
c	Klinisch
Ca	Calcium
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	Konfidenzintervall
CK	Cytokeratin
Cu	Kupfer
dCK+	Disseminierte Cytokeratin-positive Zellen
DTC	Disseminated tumor cell
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCam	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	Östrogenrezeptor
erbB2	Human epidermal growth factor receptor 2
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Grading
g	Gramm
G1	Tumorgewebe gut differenziert
G2	Tumorgewebe mäßig differenziert
G3	Tumorgewebe schlecht differenziert
GnRHa	Gonadotropin-Releasing-Hormon Analoga

HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
hMAM	Humanes Mammaglobin
HR	Relatives Risiko, Hazard Ratio
HRP	Streptavidin-Meerrettichperoxidase
IBTR	Ipsilateral breast tumor recurrence
IHC	Immunhistochemie
IgG	Antikörper der Klasse G
Int2	Int2-Onkogen
Ki-67	Ki-67 (Proliferationsmarker)
KRT19	Genname Keratin 19
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen bekannt
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Lymphknotenmetastase
N0	Nodalnegativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NST	No specific type
OS	Gesamtüberleben, Overall Survival
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PR	Progesteronrezeptor
R0	R0-Resektion, Entfernung des Tumors im Gesunden
R1	R1-Resektion, mikroskopischer Befall der Resektionsränder
R2	R2-Resektion, makroskopischer Befall der Resektionsränder
RT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S3	Leitlinie mit allen Elementen einer systematischen Entwicklung
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SLNB	Sentinel Lymph Node Biopsy
t-PA	Tissue/ Gewebe-Typ Plasminogenaktivator
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung

TMB	Tetramethylbenzidin Perborat, Peroxidase Substrat
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWIST1	Genname TWIST1
Tx	Tumor (Größe des Primärtumors) x
UICC	Union internationale contre le cancer
uPA	Urokinasetyp Plasminogenaktivator
uPA-R	Urokinasetyp Plasminogenaktivator-Rezeptor
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer



## 1. Einleitung

### 1.1 Das Mammakarzinom

#### 1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2014 erkrankten in Deutschland rund 69000 Frauen an invasiven Tumoren der Brust. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 64 Jahren [1]. Das heißt im Laufe ihres Lebens erkrankt durchschnittlich jede achte Frau an Brustkrebs. Derzeit kann in Deutschland ein leichter Rückgang der Brustkrebsmortalität beschrieben werden.

Dazu haben im Wesentlichen zwei Faktoren beigetragen:

Die Gründung von zertifizierten Brustkrebszentren, als primärer Anlaufpunkt für erkrankte Patientinnen garantiert ein umfassendes Therapiekonzept unter Einschluss aller Fachdisziplinen sowie einer individuellen operativen Strategie. In den jeweiligen Zentren konnte eine deutliche Verbesserung der Ergebnisqualität sichergestellt werden, mitunter durch den leitliniengerechten Einsatz der vorhandenen Therapiemöglichkeiten [2].

Zum anderen gelang es in den letzten Jahren durch eine exakte histopathologische Klassifizierung einen Wandel in den therapeutischen Entscheidungen bei Karzinomen der Brust herbeizuführen. Brustkrebs wird nicht mehr länger als Erkrankung mit einem generellen Therapiekonzept angesehen, sondern vielmehr als eine Krebserkrankung, die mit einem personalisierten, individuellen Therapiekonzept behandelt werden sollte. Fortschritte finden sich beim Mammakarzinom deshalb vor allem auf dem Gebiet der modernen molekularen Biomarker.

In Kombination mit klassischen Kriterien zur Charakterisierung des Mammakarzinoms führte dies zu einer verbesserten Behandlung beim frühen wie auch fortgeschrittenen Mammakarzinom [3]. Ziel der modernen Behandlung des Mammakarzinoms muss es deshalb weiterhin bleiben, eine möglichst exakte Beschreibung des Tumors mit verschiedenen Parametern zu etablieren, um geeignete Empfehlungen für oder gegen eine adjuvante Systemtherapie treffen zu können. Diese prognostischen und prädiktiven Faktoren sollen im Folgenden vorgestellt werden.

### 1.1.2 Klassifizierung des Mammakarzinoms

#### 1.1.2.1 Pathologische Grundlagen

Neunzig Prozent der invasiven Mammakarzinome lassen sich nach ihrem Wachstumsmuster in invasiv-lobulär und invasiv-duktral einteilen [4]. Letztere haben einen Anteil von circa 40 – 75 % und werden nach neuer Nomenklatur auch als „no specific type (NST)“ bezeichnet. Aus dem Namen geht bereits hervor, dass diesen Tumoren charakteristische, spezifische Tumoreigenschaften fehlen und sie damit keinem eindeutigen histologischen Typ zugerechnet werden können [5].

Bei den invasiv-lobulären Mammakarzinomen sind kleine Zellen, die aufgrund fehlender Adhäsion zueinander ein dissoziiertes Wachstumsmuster bewirken, charakteristisch [5]. Mit 5 – 15 % ist der Anteil der invasiv-lobulären Mammakarzinome am Gesamtkollektiv deutlich geringer.

Sehr viel seltener finden sich die anderen Tumortypen wie das tubuläre, kribriforme, muzinöse oder medulläre Mammakarzinom.

#### 1.1.2.2 Stadieneinteilung

Um eine differenzierte Aussage bzgl. Überlebensrate und Prognose einer lokalisierten Krebserkrankung zu tätigen, wurde bereits im Jahr 1953 durch das *Committee on Tumour Nomenclature and Statistics* die Einführung des TNM-Systems entwickelt. Man einigte sich darauf, eine Einteilung unter Berücksichtigung der Ausbreitung des Primärtumors, des Fehlens oder Vorhandenseins von regionären Lymphknotenmetastasen sowie der Existenz von Fernmetastasen zu etablieren [6]. Analog wird zur Beschreibung des Erkrankungsausmaßes beim Mammakarzinom die Größe des exstirpierten Primärtumors (T) gemessen, die Anzahl der regionär tumorbefallenen Lymphknoten (N) bestimmt und evaluiert, ob Fernmetastasen (M) vorhanden sind. Die aktuelle TNM-Klassifikation findet sich in Tabelle 1. Die Klassifikation gilt für Karzinome der männlichen und weiblichen Brust.

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
	pTis (DCIS) duktales Carcinoma in situ
	pTis (LCIS) lobuläres Carcinoma in situ
	pTis (Paget) M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	pT1mic Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	pT1a mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
	pT1b mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
	pT1c mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
	pT4a Ausdehnung auf die Brustwand
	pT4b Ödem (einschließlich Apfelsinhaut) oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust
	pT4c Kriterien 4a und 4b gemeinsam
	pT4d entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
pN	Regionäre Lymphknoten
pNX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder bereits früher entfernt)
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pNmi	Mikrometastase (größer als 0,2 mm aber nicht größer als 0,2 cm)
pN1	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n) nachgewiesen durch Untersuchung des Schildwächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar
	pN1a Metastase(n) in 1-3 axillären Lymphknoten, zumindest eine Metastase mehr als 0,2 cm in größter Ausdehnung
	pN1b Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), nachgewiesen durch Untersuchung des Schildwächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar
	pN1c Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten und Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n) nachgewiesen durch Untersuchung des Schildwächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar
pN2	Metastase(n) in 4-9 axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
	pN2a Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten, zumindest eine Metastase mehr als 0,2 cm in größter Ausdehnung
	pN2b Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen in 10 oder mehr ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbarer(en), nur mikroskopisch nachweisbarer(en) Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna oder Metastase(n) in supraklavikulären Lymphknoten
	pN3a Metastase(n) in 10 oder mehr ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine größer als 0,2 cm) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
	pN3b Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Lymphknotenmetastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Untersuchung des/der Schildwächterlymphknoten(s), aber nicht klinisch erkennbar
	pN3c Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pM	Fernmetasen
pMX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
pM0	keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 1: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms nach [6,7]

### 1.1.2.3 Grading

Die histopathologische Graduierung nach Elston und Ellis [8] erfolgt unter Einschluss von histologischen und cytologischen Kriterien. Dabei werden Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate semiquantitativ erfasst. Tabelle 2 zeigt das

zugrundeliegende Scoresystem. Aus dem jeweiligen Punktwert leitet sich das Grading ab (Graduierung: G1 – G3 bzw. gut – schlecht differenziert). Die Graduierung korreliert signifikant mit Lymphknotenstatus, Rezidivrate, Mortalitätsrate und Rezeptorstatus [5,9], weshalb alle Mammakarzinome graduiert werden müssen [5,9].

Merkmale	Kriterien	Scorewert	
Tubulusausbildung	>75%	1	
	10-75%	2	
	<10%	3	
Kernpolymorphie	gering	1	
	mittelgradig	2	
	stark	3	
Mitoserate	0-5/10 HPF	1	
	6-11/10 HPF	2	
	≥12/10 HPF	3	
Summenscore		3-9	
Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3,4,5	gering	G1	gut differenziert
6,7	mäßig	G2	mäßig differenziert
8,9	hoch	G3	schlecht differenziert
HPF=High Power Field. Die angegebenen Kriterien gelten für einen Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm entsprechend einem Lichtmikroskop mit Sehfeldzahl 18			

**Tabelle 2:** Grading nach Elston und Ellis [8,9]. Scoresystem zur histologischen Graduierung (Grading)

### 1.1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren

Tumorgroße und Nodalstatus stellen sicherlich entscheidende Faktoren in der Betrachtung eines invasiven Mammakarzinoms dar. Morphologische Gesichtspunkte alleine beschreiben die biologische Aktivität des Tumors und seine Fähigkeit Metastasen zu bilden nur eingeschränkt. Für eine Prognose und den weiteren Verlauf der Erkrankung ist mitunter die Tumorbilogie von entscheidender Bedeutung. Außerdem ergeben sich aus ihr zielgerichtete Therapieansätze, welche in Kapitel 1.1.4 erläutert werden.

#### 1.1.3.1 Prädiktive Faktoren

##### 1.1.3.1.1 Östrogen-/ Progesteronrezeptorstatus

Das Ausmaß der Östrogen-/ Progesteronrezeptorexpression beeinflusst den weiteren Verlauf der Erkrankung entscheidend und korreliert mit der Prognose. Studien zu

diesem Zusammenhang sind relativ alt, da durch den konsequenten Einsatz der antiöstrogenen Therapie prognostische Effekte oft nicht mehr erkennbar sind. Jedoch zeigen ER-positive Tumore ein circa 5 – 10 % besseres Gesamtüberleben [10]. Deshalb kommt der Bestimmung der Östrogen-/ Progesteronrezeptorexpression aktuell vor allem eine Bedeutung in der Indikationsstellung für eine antiöstrogene Therapie zu.

#### 1.1.3.1.2 HER2/neu

Der „Human Epidermal Growth Factor Receptor 2“ (HER2) vermittelt als einer von vier Wachstumsfaktorrezeptoren Signale an den Zellkern. Über diesen Mechanismus ist der HER2-Rezeptor am Fortschreiten von Krebserkrankungen beteiligt, indem er unter anderem Effekte auf Apoptose, Mitose, Tumorzellinvasion und Neoangiogenese hat [9,11]. Gemäß der S3-Leitlinie Mammakarzinom 2017 sollte HER2/neu beim invasiven Mammakarzinom als prädiktiver Faktor bestimmt werden [12]. Es sollte zudem zur besseren Reproduzierbarkeit ein zuverlässiges Verfahren mit standardisierten Testkits gewählt werden [12]. Bei HER2/neu-Positivität kann eine adjuvante zielgerichtete Anti-HER2-Therapie begonnen werden (siehe Kapitel 1.1.4.4).

#### 1.1.3.1.3 Ki-67

Beim Versuch, Mammakarzinome anhand ihrer Genexpression zu klassifizieren, wurden in den Studien vier verschiedene molekulare Tumorsubtypen unterschieden, welche sich im Therapieansprechen signifikant voneinander unterscheiden: Luminal-A, Luminal-B, HER2-positive, basal-like/ Triple negative [12].

Da eine derartige Klassifizierung mittels Array-Analysen aber im klinischen Routinebetrieb zu aufwendig ist, wurde in den letzten St.-Gallen-Konsensus-Empfehlungen eine vereinfachte Einteilung präsentiert, welche die genetischen Subtypen widerspiegeln soll. Ki-67 nimmt dabei, wie in Tabelle 3 ersichtlich, einen Stellenwert in der Unterscheidung zwischen Luminal A-like- vs. Luminal B-like-Tumoren ein [12].

Subtyp	Luminal A-like	Luminal B-like		HER2-positiv	Triple-negativ
		HER2-negativ	HER2-positiv	non-luminal	duktal
† ER/PgR	hoch positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
‡ HER2	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ
†† Ki-67/G	nieder < 14 %/G1	hoch ≥ 14 %/G3	-	-	-
Häufigkeit	~ 65 %		~ 10 %	~ 10 %	~ 15%
Therapie	ET*	CT + ET	CT + T + ET	CT + T	CT

ca. 60 %

**Tabelle 3:** Risikoeinschätzung nach molekularbiologischem Subtyp St. Gallen (ET=endokrine Therapie; CT= Chemotherapie; T=Trastuzumab) [13]

Darüber hinaus wurde die prognostische Bedeutung des Proliferationsmarkers Ki-67 durch einige Studien belegt [14,15], so dass Ki-67 zur Prognoseabschätzung als unabhängiger prognostischer Marker auch in die S3-Leitlinie Mammakarzinom 2017 mit aufgenommen wurde [12].

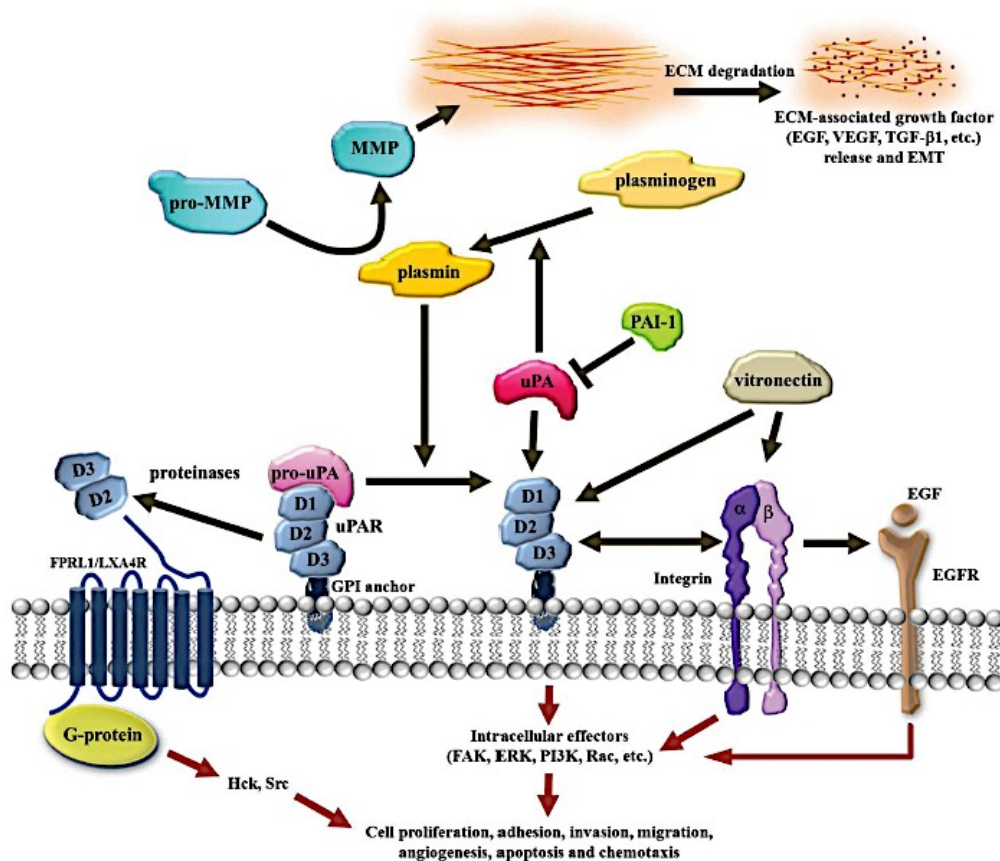
#### 1.1.3.1.4 uPA/PAI-1

Die beiden Proteasen uPA und t-PA sind als Plasminogenaktivatoren in der Lage Plasminogen durch Spaltung der Peptidbindung Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup> in aktiviertes Plasmin überzuführen [16]. Plasminogen findet sich vor allem im Blutgefäßsystem, ist allerdings auch im Gewebe anzutreffen. Selbstverständlich besteht eine der vorrangigen Aufgaben des Plasmins darin, Blutgerinnsel abzubauen. Allerdings gibt es ebenfalls Effekte, welche das Fortschreiten einer malignen Erkrankung begünstigen.

In erster Linie kann Plasmin (im aktivierten Zustand) durch seine proteolytischen Eigenschaften die extrazelluläre Matrix abbauen und verändern. Beispiele hierfür sind z. B. der Gewebeumbau während der Ovulation, entzündliche Prozesse, Wundheilung und Angiogenese und eben auch Tumorinvasion und Metastasierung [16].

Da uPA die Fähigkeit hat, das Proenzym Plasminogen in die Serinprotease Plasmin zu spalten, ist es dadurch indirekt in der Lage, Tumorstroma und Basalmembranen abzubauen und somit Invasions- und Migrationsprozesse sowie die frühe Zelldissemination in Gang zu setzen. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass

Plasminogenaktivatoren im Tumorgewebe bereits vor einigen Jahren nachgewiesen werden konnten [17]. Zahlreiche Studien bestätigen insbesondere bei Karzinomen der Brust, dass höhere Konzentrationen von uPA eine schlechtere Prognose mit erhöhtem Risiko zur Metastasenbildung bewirken [18,19,20].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung uPA als Plasminogenaktivator [21]

Dementsprechend war die naheliegende Vorstellung, dass Plasminogenaktivator-Inhibitoren das Tumorstadium begrenzen und Metastasierung verhindern können. Allerdings geht ein erhöhter Antigengehalt von PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor 1) – im Gegensatz zu PAI-2 – ebenfalls mit erhöhter Tumorstadium und schlechterer Prognose einher [22,23]. Die Gründe hierfür liegen in dem Umstand, dass PAI-1 negative Effekte auf Zelladhäsion und -migration sowie auf den programmierten Zelltod hat [23,24,25].

Beide Proteasen (Urokinase-type plasminogen activator (uPA) und sein Inhibitor PAI-1) nehmen unbestritten neben anderen Faktoren eine Schlüsselrolle in der Fähigkeit des

Tumors zur Invasion und zur Metastasierung ein [18]. Als prospektive Biomarker waren uPA/PAI-1 auch Gegenstand des Chemo-N0 trials [26]. Nach zehn Jahren Nachbeobachtung konnte eine Niedrigrisikogruppe (uPA/PAI-1 niedrig) identifiziert werden, welche von einer adjuvanten Chemotherapie nur marginal profitierte. Demgegenüber konnte in der Hochrisikogruppe (uPA/PAI-1 hoch) durch eine adjuvante Chemotherapie das Risiko für ein Rezidiv um 40 % gesenkt werden [26]. UPA/PAI-1 sind demnach nicht nur prognostische Faktoren, sondern dienen auch als Indikatoren für das Ansprechen einer adjuvanten Chemotherapie [27].

In der klinischen Therapieplanung und prognostischen Evaluierung des invasiven Mammakarzinoms wird in den aktuellen „S3-Leitlinien Mammakarzinom 2017“ der Proteasenbestimmung jedoch eine geringere Bedeutung zugesprochen [12]. In den ASCO-Leitlinien 2016 findet sich eine Empfehlung für die Bestimmung von uPA/PAI-1 beim nodal-negativen Mammakarzinom mit positivem Östrogen/ Progesteron- und negativem HER2/neu-Status [28].

#### 1.1.3.2 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark

Cytokeratine gelten als spezifische Marker okkult disseminierter Zellen von Karzinomen im Knochenmark. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Anwesenheit dieser Zellen im Knochenmark das Rezidivrisiko sowie die Mortalität bei Patientinnen mit Brustkrebs in allen Stadien erhöht [29,30]. Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark stellen einen unabhängigen prognostischen Prädiktor für das Risiko des krebsassoziierten Todes dar [29,31]. Vorhandene Cytokeratin-positive Zellen im Knochenmark sind allerdings nicht gleichbedeutend mit einer Metastasierung des Knochens. Die Entwicklung zur Metastase wird nach dem ersten Schritt der Dissemination durch verschiedene molekulare Faktoren bestimmt (siehe Kapitel 1.2). Ferner konnten disseminierte Tumorzellen als nützliches Werkzeug im Sinne eines onkologischen Therapiemonitorings identifiziert werden. Janni et al. [30] untersuchten die Effekte, welche sich im Zusammenhang mit dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark nach adjuvanter Therapie einstellten. Dabei zeigten Patientinnen mit positiven disseminierten Tumorzellen nach adjuvanter Therapie ein schlechteres tumorfreies und Gesamtüberleben.



Von entscheidender Bedeutung in der vorhandenen Literatur ist zudem die Differenzierung zwischen disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen. Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen findet meist im Knochenmark statt, während zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Zirkulierende Tumorzellen können mithilfe der CellSearch® Technologie bestimmt werden. Eine Methode, die unter anderem in den AGO-Leitlinien [32] als etabliertes Verfahren zur Abschätzung der Prognose bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom angesehen wird.

#### 1.1.4 Therapie

##### 1.1.4.1 Operative Strategien

Prinzipiell stehen zwei Methoden der operativen Versorgung beim invasiven Mammakarzinom zur Verfügung: die brusterhaltende Therapie (BET) gegenüber der radikalen Mastektomie. Grundvoraussetzung ist immer die Resektion im Gesunden mit tumorfreien Resektionsrändern. Eine inkomplette Resektion erhöht das Risiko eines Lokalrezidives (ITBR=ipsilateral breast tumor recurrence) unabhängig von der Tumorbilogie [33]. Die brusterhaltende Therapie mit anschließender Bestrahlung ist der Mastektomie bzgl. des Überlebens gleichwertig [34].

Unabhängig von BET oder der Entfernung der gesamten Brust erfolgt die Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SNLB) und/ oder die Axilladisektion (ALND). Da der Sentinel-Lymphknoten die höchste Wahrscheinlichkeit der Karzinominfiltration besitzt, sollte er zur histopathologischen Tumorklassifikation entnommen werden. Die SLNB ist auch für alle Patientinnen indiziert, die einen klinisch unauffälligen Lymphknotenstatus haben [12]. Eine klassische Axilladisektion mit Entfernung von mehr als zehn Lymphknoten ist bei klinischem Verdacht auf eine fortgeschrittene Lymphknotenbeteiligung indiziert. Eine routinemäßige Axilladisektion bei positiver SLNB ist derzeit nicht zwingend angezeigt. Gemäß aktueller Empfehlung gilt, dass Patientinnen mit cT1-T2/cN0-Status, nach brusterhaltender Therapie mit Bestrahlung und Nachweis von maximal zwei positiven Lymphknoten keine axilläre Lymphknotendisektion erhalten sollten [12,35]. Bei Mastektomie oder Fehlen eines der eben genannten Kriterien sollte eine Axilladisektion durchgeführt werden [12,36].

#### 1.1.4.2 Systemische Chemotherapie

Die systemische Chemotherapie kann entweder als präoperative, neoadjuvante Therapie oder als postoperative, adjuvante Systemtherapie erfolgen. Dabei wird die neoadjuvante Cytostatikatherapie vor allem bei lokal fortgeschrittenen, inoperablen oder inflammatorischen Mammakarzinomen als Therapie der Wahl angesehen [35]. Ziel der neoadjuvanten Therapie ist es eine möglichst hohe Rate an pathologischen Komplettremissionen zu erreichen. Außerdem kann durch eine präoperative Chemotherapie eine Steigerung der Rate an brusterhaltenden Operationen realisiert werden [37].

Eine adjuvante Chemotherapie wird empfohlen bei HER2-positiven Tumoren (ab pT1b/N0 oder pT1a/N0 mit zusätzlichem Risikofaktor, z. B. G3, ER/ PR neg., Ki-67 hoch), bei Triple negativen Tumoren und bei Luminal-B-Tumoren mit hohem Rezidivrisiko (Ki-67 hoch, G3, Lymphknotenbefall) [12]. Nach den aktuellen Empfehlungen sollte derzeit ein Taxan mit einem Anthrazyklin simultan oder in Sequenz über insgesamt 18 – 24 Wochen verabreicht werden [12]. Eine adjuvante Chemotherapie hat das Ziel, das Wiederauftreten der Erkrankung zu verhindern und sollte innerhalb der ersten vier bis sechs Wochen nach der Operation begonnen werden.

#### 1.1.4.3 Hormontherapie

Zum festen Bestandteil der multimodalen Therapie des Mammakarzinoms gehört beim endokrin sensitiven (östrogen- und/ oder progesteronrezeptor positiven) Brustkrebs die antiöstrogene Therapie. Die Therapie sollte mit Tamoxifen bei prämenopausalen Patientinnen erfolgen und im Anschluss an die Chemotherapie begonnen werden. Die Therapiedauer darf fünf Jahre nicht unterschreiten [38]. Bei jungen, prämenopausalen Frauen mit erhöhtem Rückfallrisiko kann der Einsatz einer Ovarialsuppression mit z. B. GnRHa oder eine bilaterale Ovariectomie erwogen werden [39]. Bei postmenopausalen Patientinnen sollte ein Aromatasehemmer Bestandteil der endokrinen Therapie sein [39].

#### 1.1.4.4 Anti-HER2-Therapie (Trastuzumab)

Bei Tumoren mit HER2-Überexpression und einem Durchmesser  $\geq 1$  cm gehört zusätzlich zur (neo-)adjuvanten Chemotherapie die Behandlung mit Trastuzumab – einem monoklonalen humanisierten Antikörper – zur Standardtherapie [12,32]. HER2-Überexpression liegt vor, wenn ein immunhistochemischer Score 3+ oder 2+ mit HER2-Genamplifikation im FISH nachgewiesen wurde. Die AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie) empfiehlt sogar ab einer Tumorgroße  $\geq 0,5$  cm bei pN0 eine Therapie mit Trastuzumab [9,32]. Die Gesamttherapiedauer sollte ein Jahr betragen [12,40].

#### 1.1.4.5 Adjuvante Radiotherapie

Alle Patientinnen – auch mit nodal-negativem Lymphknotenstatus – können nach BET ein Lokalrezidiv entwickeln. Zur Optimierung der lokalen Tumorkontrolle stellt die adjuvante Strahlentherapie die wichtigste Methode dar und kann das Risiko eines lokoregionalen Rezidivs nachhaltig entschärfen [41]. In den Studien von Clarke et al. und Corradini et al. konnte ein vermindertes Vorkommen von Rezidiven bei bestrahlten Patientinnen beobachtet werden, was die Effektivität der Methode klar belegt [41,42]. Dementsprechend ist eine Bestrahlung der betroffenen Brust nach BET gemäß aktueller Leitlinienempfehlungen unerlässlich [12].

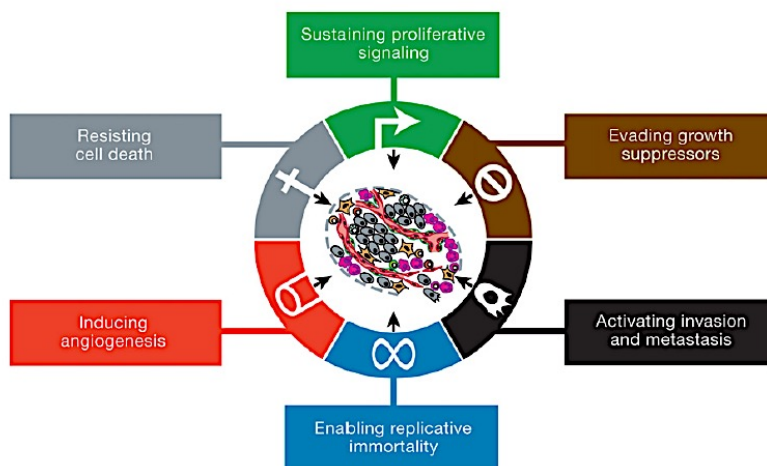
Auch nach Mastektomie senkt die adjuvante Strahlentherapie das Risiko der Entstehung eines lokoregionären Rezidivs [43]. Entsprechend der aktuellen S3-Leitlinie 2017 sollten Patientinnen mit folgenden Risikofaktoren eine adjuvante Radiotherapie erhalten [12]:

- pT4
- pT3 pN0 R0 bei Vorliegen von Risikofaktoren (Lymphgefäßinfiltration, G3, prämenopausal, Alter  $< 50$  Jahre)
- mehr als drei befallene axilläre Lymphknoten
- bei 1 – 3 befallenen Lymphknoten, wenn ein erhöhtes Rezidivrisiko vorliegt
- R1-/R2-Resektion und fehlender Nachresektionsmöglichkeit [12].

## 1.2 Tumorbilogie der malignen Transformation, Tumorinvasion und Metastasierung

Bereits 2010 beschrieben Hanahan und Weinberg die sogenannten „Hallmarks of Cancer“ als Markenzeichen, welche zur neoplastischen Transformation notwendig sind [44]. Eine Neuerung der Beschreibung erfolgte 2011. Die sechs Kennzeichen („hallmarks“) setzen sich wie folgt zusammen:

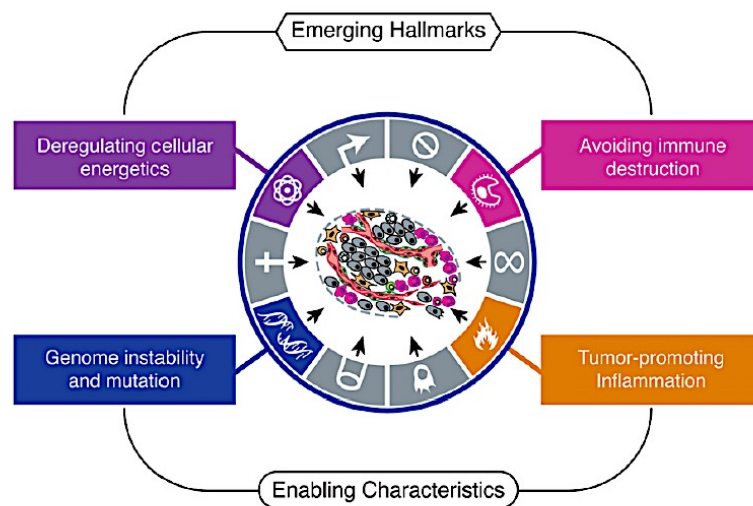
- Proliferation (sustaining proliferative signaling)
- Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren (evading growth suppressors)
- Auslösen von Invasion und Metastasierung über epithelial-mesenchymale Transitionsprogramme (EMT) (activating invasion and metastasis)
- Unbegrenzte Replikationsfähigkeit (enabling replicative immortality)
- Bildung neuer Blutgefäße (inducing angiogenesis)
- Apoptose (resisting cell death) [44].



**Abbildung 2:** Hallmarks of Cancer (Hanahan und Weinberg 2016) [44]

Zudem wurden von Hanahan und Weinberg neu aufkommende Merkmale (emerging hallmarks) beschrieben, welche vor allem durch steigendes Interesse in der Forschung auf sich aufmerksam machten:

- Deregulation der zellulären Energiekontrolle (deregulating cellular energetics)
- Gestörte Detektion oder Zerstörung von Tumorzellen durch das Immunsystem (avoiding immune destruction).

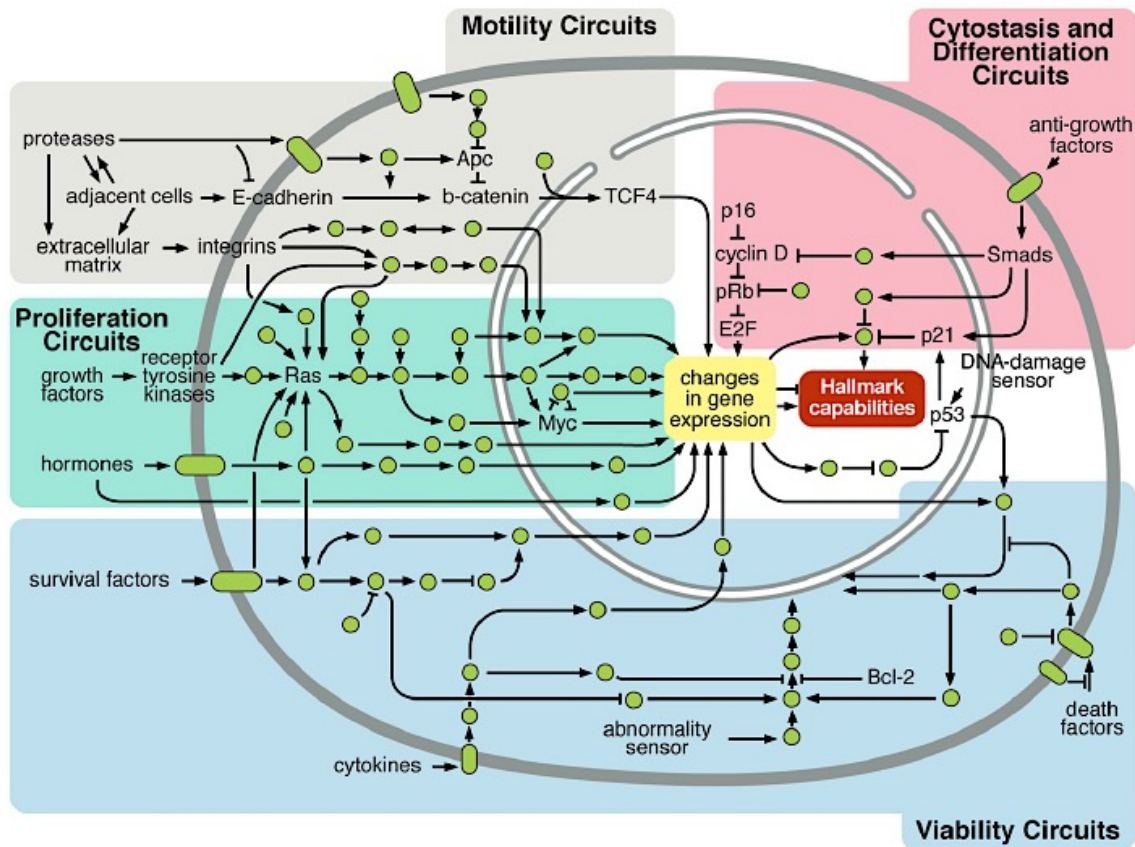


**Abbildung 3:** Emerging Hallmarks und Enabling Characteristics (Hanahan und Weinberg 2016) [44]

Diese Merkmale („hallmarks“) stellen erworbene funktionelle Eigenschaften der Tumorzellen dar, welche es den Krebszellen erlauben zu überleben, zu proliferieren und zu disseminieren. Die Aneignung dieser Eigenschaften wird ermöglicht durch bestimmte Eigenarten in Tumorzellen und -gewebe („enabling characteristics“). Zum einen bietet die genetische Instabilität (genome instability and mutation) in Krebszellen die Möglichkeit für Mutationen und chromosomale Neuordnung, welche wiederum den Erwerb von „hallmark“-Eigenschaften begünstigt.

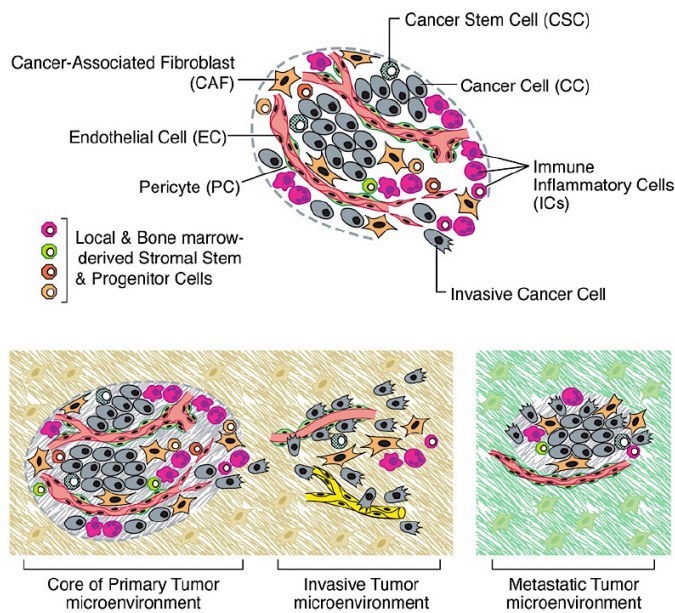
Zum anderen wird durch die inflammatorische Beschaffenheit in prämaligen Läsionen die Tumorprogression begünstigt [44].

Abbildung 4 zeigt regulatorische Schaltkreise, welche in normalen gesunden Zellen ebenfalls vorhanden sind. In Krebszellen führt die Umprogrammierung dieser Schaltkreise zum Erwerb von „hallmark“-Eigenschaften. Zwischen den einzelnen Schaltkreisen, welche die jeweiligen „hallmark“-Eigenschaften generieren, bestehen, wie in Abbildung 4 ersichtlich, ausgeprägte Überlappungen. So ist es nicht verwunderlich, dass ein einzelnes onkogenes Ereignis mehrere „hallmark“-Eigenschaften begünstigen kann.



**Abbildung 4:** Intrazelluläre Signalregulation der Krebszelle (Hanahan und Weinberg 2016) [44]

Ein wichtiger Aspekt ist zudem, dass Tumore nicht länger als eine isolierte Anhäufung schnell proliferierender Zellen betrachtet werden sollten. Vielmehr bestehen sie aus unterschiedlichen Zellen (z.B. Cancer Stem Cells, Immun Inflammatory Cells, Cancer-Associated Fibroblasts), welche miteinander kommunizieren und zusammen ein komplex interagierendes Gewebe bilden. Tumorgewebe setzt sich mitnichten nur aus Tumorzellen zusammen, sondern enthält auch normale Zellen (wie beispielsweise Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen) sowie eine eigene extrazelluläre Matrix (ECM) [44]. Die Vielzahl an nicht-neoplastischen Zellen, die ein Tumor enthält, sind beispielsweise an der Bildung eines Tumor-assoziierten Stromas, welches eine optimale Mikroumgebung für Tumorstromawachstum, Infiltration und Ausbreitung darstellt, beteiligt [44].



**Abbildung 5:** Zellen der Tumormikroumgebung (Hanahan und Weinberg 2016) [44]

Gerade im Zusammenhang der Betrachtungen beim invasiven Mammakarzinom spielen die Fähigkeiten des Tumors zur Infiltration und Zersetzung der extrazellulären Matrix eine Schlüsselrolle.

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Das uPA/PAI-1 Proteasensystem besitzt Ansatzpunkte an verschiedenen funktionellen Zielstrukturen und kann pathophysiologische Kaskaden anstoßen, welche für Tumorprogression, -invasion und -migration von zentraler Bedeutung sind. Neben ihrer Bedeutung bei der Zersetzung der extrazellulären Matrix haben uPA/PAI-1 Effekte, welche den Erwerb der „hallmark“-Eigenschaften wie Proliferation, Hemmung der Apoptose und Angiogenese betreffen. Es ist deshalb nicht überraschend, dass uPA/PAI-1 prognostische Bedeutung für viele Krebsarten besitzen. Beim invasiven Mammakarzinom wird die Bestimmung der Proteasen sogar in Leitlinien empfohlen [28].

Zirkulierende Tumorzellen im Blut und disseminierte Tumorzellen im Knochenmark werden als Ursprung für die Entstehung entfernter Metastasen betrachtet. Obwohl deren Bestimmung im klinischen Routinebetrieb noch keinen Einzug erfahren hat,

konnte die prognostische und klinische Bedeutung in mehreren Studien belegt werden, insbesondere bei invasiven Tumoren der Brust [29].

Die Zielsetzung dieser retrospektiven Studie ist es Zusammenhänge und Interaktionen zwischen dem uPA/PAI-1 Proteasensystem und dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark beim Mammakarzinom zu identifizieren.

Des Weiteren soll neben etablierten Prognosefaktoren wie TNM-Klassifikation, Grading und Östrogen-/ Progesteronrezeptorstatus die prädiktive Wertigkeit von uPA/PAI-1 in Verbindung mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark untersucht werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 480 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom in die Studie eingeschlossen. Bei jeder Patientin wurden vor Beginn der eigentlichen Operation in Narkose Knochenmarkaspirate aus beiden Beckenkämmen abgenommen. Parallel wurden am entnommenen Tumor die uPA/PAI-1 Gewebekonzentrationen bestimmt. Alle Patientinnen erhielten zudem eine vollständige klinische und pathologische TNM-Klassifikation der UICC sowie ein histopathologisches Grading des Primärtumors. Eine vollständige Registrierung und Nachbeobachtung aller Patientinnen wurde durch das Tumorzentrum Augsburg erhoben.

### 2.2 Nachbeobachtung und Follow-up

Aktuelle Follow-up-Daten wurden vom Tumorzentrum Augsburg bereitgestellt und anschließend ausgewertet. Um eine hohe Qualität und Validität der Daten sicherzustellen, wurde die Nachbeobachtung der Patientinnen zusätzlich ergänzt durch Einsicht der Akten aus dem elektronischen Krankenhausinformationssystem (ORBIS) des Klinikums Augsburg. Dabei wurden insbesondere die folgenden Faktoren einer exakten Überprüfung unterzogen und ggf. korrigiert:

- das krankheitsfreie Überleben
- das Gesamtüberleben
- nicht gemeldete Sterbefälle
- sekundäre Therapieänderungen wie z. B. zusätzliche operative bzw. adjuvante Therapien, welche zunächst abgelehnt, jedoch im Verlauf doch durchgeführt wurden
- fehlende bzw. ausstehende histopathologische Klassifizierungen.

Der Beobachtungszeitraum ergab sich von 1999 bis 2014.

### 2.3 Beratungskommission für klinische Studien

Als retrospektive Studie wurde das Forschungsvorhaben unter Berücksichtigung der Schweigepflicht und Datenschutzbestimmungen bei der Beratungskommission für klinische Forschung (BKF) am Klinikum Augsburg beantragt. Es bestanden keine ethischen oder juristischen Einwände.

### 2.4 uPA/PAI-1 Untersuchungsverfahren

Das Untersuchungsverfahren bestand im Prinzip aus drei Teilen:

1. Mechanische Auftrennung des Tumorcytosols
2. Bestimmung der uPA/PAI-1 Konzentrationen mithilfe des Femtelle® uPA/PAI-1-Kits (Fa. Sekisui Diagnostics)
3. Gesamtproteinbestimmung mithilfe BCA™ Protein Assay Kit (Fa. Pierce)

Nach mechanischer Freisetzung des Tumorcytosols und dessen Abtrennung durch Zentrifugation wurde aus dem verdünnten Überstand das Gesamtprotein mit einem empfindlichen, von Triton nicht beeinflussten, colorimetrischen Proteinassay bestimmt. Der weitere Überstand wurde verdünnt und die Konzentrationen von uPA und PAI-1 wurden in verschiedenen beschichteten Mikrotiterplatten (mit anti-uPA bzw. anti-PAI-1) nach dem Sandwich-Prinzip ermittelt.

Die Befunde wurden als ng uPA/mg Protein bzw. ng PAI-1/mg Protein als Gewebekonzentration mitgeteilt. Folglich wurde der Anteil der uPA/PAI-1 Konzentration zur Proteinkonzentration im Tumorcytosol bestimmt. Beide Größen wurden durch die entsprechenden Test-Kits exakt bestimmt.

#### Material und Lösungen

- anti-human uPA IgG beschichtete Mikrotiterplatten (farblos)
- anti-human PAI-1 IgG beschichtete Mikrotiterplatten (rot markiert)
- 6 Fläschchen uPA Standard mit in ng/ml kalibriertem uPA (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 ng/ml)

- 6 Fläschchen PAI-1 Standard mit in ng/ml kalibriertem PAI-1 (0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ng/ml)
- uPA Detektionsantikörper: biotinyliertes anti-human uPA (lyophilisiert)
- PAI-1 Detektionsantikörper: biotinyliertes anti-human PAI-1 (lyophilisiert)
- uPA Enzym Konjugat, Streptavidin – HRP (60 µl)
- PAI-1 Enzym Konjugat, Streptavidin – HRP (60 µl)
- Enzymkonjugat Verdünner (lyophilisiert)
- PBS Puffer (PBS), pH 7,4
- Detergenz, 25%ige Triton X-100 (12ml)
- Waschpuffer (1 Tüte PBS in 900ml dest. Wasser, 4 ml 25%ige Triton X zugeben; auf 1000ml auffüllen)
- Rinderserum Albumin
- Probenpuffer (0,3 g Rinderserum Albumin in 30 ml Waschpuffer)
- Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 8,5 (lyophilisiert)
- Peroxidase Substrat (TMB) (11 ml)
- 0,22 µm gefiltertes deionisiertes H<sub>2</sub>O (1 l)
- Präzisionspipetten: 2 – 20 µl, 100 µl, 20 – 200 µl und 100 – 1000 µl mit original Eppendorf Pipettenspitzen
- Multipipetten für 100 µl und 150 µl
- Photometer, Messwellenlänge 450 nm bzw. 570 nm
- Kryogefäße – 1 ml
- Flüssiger Stickstoff
- Ultrazentrifuge mit Rotor (18.000 Umdrehungen pro Minute)
- Ultrazentrifugenröhrchen
- Test-Röhrchen – 2 ml
- Polystyrolröhrchen – 5 ml
- Ultra-Turrax
- Schüttler für Mikrotiterplatten und Reaktionsgefäße
- 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- BCA Protein Bestimmungstest
- Kontrollproben

#### 2.4.1 Gewebeaufbereitung

Nach dem operativen Eingriff kam das Gewebe ohne Verzögerung zur weiteren Begutachtung bzw. Schnellschnittuntersuchung in das Labor der Pathologie. In der Folge wurde der betroffene Tumor vom Pathologen herauspräpariert und vom umgebenden Fettgewebe befreit. Das gereinigte Gewebe wurde schließlich unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Anschließend wurden etwa 50 – 300 mg des tiefgefrorenen Gewebes mit 1%iger Triton X-100 Lösung (8 ml 25%ige Triton-X 100 in 12 ml dest. Wasser und 180 ml TBS, pH 8,5) suspendiert und mithilfe eines Ultra-Turrax zerkleinert. Um ein Erwärmen der Suspension zu verhindern, wurde sie max. 10 Sekunden am Stück unter Kühlung im Eiswasserglas gedreht. Danach wurden die Proben für 14 – 16 Stunden (über Nacht) vorsichtig im Eppendorfgefäß geschüttelt.

Um die Zelltrümmer abzutrennen wurde die Suspension am Folgetag mit 18.000 Umdrehungen für eine Stunde bei  $-3^{\circ}$  zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Tumorcytosol wurde anschließend aliquotiert und den weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration sowie den uPA/PAI-1 Konzentrationen zugeführt.

Für die Anwendung im ELISA wurde der Gewebeextrakt in Abhängigkeit der Tumoreinwaage mit Probenpuffer verdünnt (siehe Tabelle 4). Die Verdünnung erfolgte unter Eiskühlung mit kaltem Probenpuffer in Polystyrolröhrchen. Die verdünnten Cytosole wurden anschließend direkt im uPA/PAI-1 Ansatz eingesetzt (siehe Kapitel 2.4).

Tumoreinwaage 0,005 - 0,015 Gramm	Verdünnung 1 : 3	Verdünnung 1 : 12
Durchführung	200 µl Cytosol + 400 µl Probenpuffer	150 µl 1:3 verd. Cytosol + 450 µl Probenpuffer
Tumoreinwaage 0,015 - 0,025 Gramm	Verdünnung 1 : 6	Verdünnung 1 : 31
Durchführung	100 µl Cytosol + 500 µl Probenpuffer	20 µl Cytosol + 600 µl Probenpuffer
Tumoreinwaage 0,025 - 0,050 Gramm	Verdünnung 1 : 11	Verdünnung 1 : 51
Durchführung	50 µl Cytosol + 500 µl Probenpuffer	10 µl Cytosol + 500 µl Probenpuffer
Tumoreinwaage 0,05 - 0,5 Gramm	Verdünnung 1 : 21	Verdünnung 1 : 101
Durchführung	25 µl Cytosol + 500 µl Probenpuffer	10 µl Cytosol + 1000 µl Probenpuffer
Tumoreinwaage > 0,5 Gramm	Verdünnung 1 : 201	Verdünnung 1 : 401
Durchführung	10 µl Cytosol + 2000 µl Probenpuffer	10 µl Cytosol + 4000 µl Probenpuffer

**Tabelle 4:** Cytosolverdünnung in Abhängigkeit zur Tumoreinwaage

## 2.4.2 uPA/PAI-1 Bestimmung

### 2.4.2.1 Prinzip der uPA/PAI-1 Bestimmung

Femtelle und damit die Bestimmung der uPA/PAI-1 Spiegel im Gewebe mit bekannter Proteinkonzentration beruht auf dem Prinzip von hochspezifischen monoklonalen Maus-Fängerantikörpern, die gegen humanes uPA oder PAI-1 gerichtet sind. Die Tumorextrakte wurden zur Bindung des Antikörpers, welcher sich in den Vertiefungen der Mikrotiterstreifen befand, auf diesen über Nacht inkubiert.

Nach Waschen der Proben wurde der biotinylierte Zweitantikörper, welcher wiederum gegen anti-human uPA bzw. anti-human PAI-1 gerichtet war, zur Detektion hinzugegeben. Nach kurzer Inkubationszeit konnte dieser mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP) Konjugat sichtbar gemacht werden. Anschließend war es noch notwendig, das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Perborat (TMB)

hinzugeben, das durch HRP umgewandelt wurde und so zu einer Blaufärbung führte. Nach Zugabe von Schwefelsäure wurde die Reaktion beendet und die Färbung schlug von blau nach gelb um. Die uPA und PAI-1 Konzentrationen wurden durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm mithilfe der ebenfalls bei 450 nm ermittelten Standardkurve abgelesen.

#### 2.4.2.2 Durchführung des Assays

Die Testdurchführung des Femtelle uPA/PAI-1 gliederte sich in zwei Tage. Am ersten Tag wurden je 100 µl des uPA/PAI-1 Standards, der Kontrolle und natürlich der zu untersuchenden, verdünnten Gewebeprobe in die entsprechenden Vertiefungen des Mikrotiterstreifens gegeben. Die Vertiefungen waren mit Anti-uPA bzw. Anti-PAI-1 beschichtet und wurden über Nacht bei +4° in der feuchten Kammer inkubiert. Es wurde immer eine Doppelbestimmung vorgenommen. Am Mikrotiterstreifen ergab sich damit eine fixe Anordnung nach dem untenstehenden Schema (siehe Tabelle 5).

	1	2
A	Std 0	Std 4
B	Std 0	Std 4
C	Std 1	K1
D	Std 1	K1
E	Std 2	P1 (Verdünnung 1)
F	Std 2	P1 (Verdünnung 1)
G	Std 3	P1 (Verdünnung 2)
H	Std 3	P1 (Verdünnung 2)

**Tabelle 5:** Plattenschema für uPA bzw. PAI-1 (Std=Standard; K=Kontrolle; P=Gewebeextrakt)

Am zweiten Tag wurde der Inhalt des Mikrotiterstreifens verworfen und die Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden je 100 µl des uPA Detektionsantikörpers in die uPA beschichteten Vertiefungen bzw. 100 µl des PAI-1 Detektionsantikörpers in die PAI-1 beschichteten Vertiefungen gegeben und wiederum nach Abdeckung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Verwerfen des Inhalts und viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurden je 100 µl des verdünnten uPA bzw. PAI-1 Enzymkonjugats in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Das verdünnte Enzymkonjugat erhielt man, indem man bereits zuvor 2 µl Enzymkonjugat in 2 ml Verdünnungslösung gab. Nach erneutem Abdecken und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden die Inhalte verworfen und viermal mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte noch die Zugabe von je 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung. Unter erneutem Abdecken und Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur kam es zur Reaktion mit Blaufärbung. Die Reaktion wurde schließlich durch Zugabe von 50 µl 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beendet, was zu einem Farbumschlag nach gelb führte. Die anschließende Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm. Mithilfe der Standardproben erhielt man eine annähernd lineare Standardkurve, welche als Bezugspunkt für die Messwerte der Patientinnenproben diente. Nach Messung des entsprechenden Extinktionswertes für die Kontrolle und die Probe konnte die entsprechende uPA bzw. PAI-1 Konzentration einfach abgelesen werden. Um die uPA bzw. PAI-1 Konzentration des Gewebeextraktes zu erhalten, musste der Probenwert nur noch entsprechend der vorangegangenen Verdünnung multipliziert werden, da der Gewebeextrakt zuvor ja entsprechend der Tumoreinwaage verdünnt in die Mikrotiterplatten gegeben wurde. Um die uPA und PAI-1 Konzentrationen in ng/mg Gesamtprotein zu erhalten, mussten die uPA und PAI-1 Werte (ng/ml) durch die Gesamtproteinkonzentration (mg/ml) des Gewebeextraktes (siehe unten) geteilt werden.

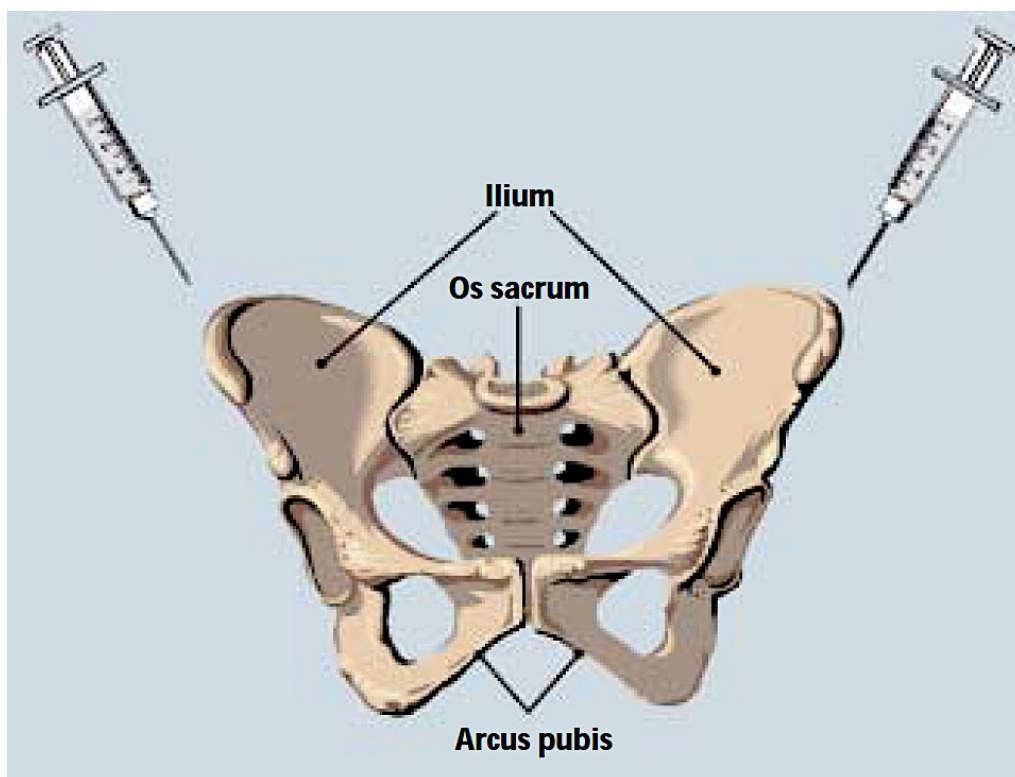
#### 2.4.3 Gesamtproteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration der Gewebeextrakte wurde mit dem BCA Proteintest von Pierce bestimmt, da dieser Test nicht durch Detergenzien gestört und durch Triton X-100 Konzentrationen bis zu 1 % nicht beeinflusst wird. Der Test basiert auf dem Umstand, dass Proteine mit Cu<sup>2+</sup> in alkalischen Lösungen einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Cu<sup>2+</sup> wird im Komplex zu Cu<sup>1+</sup> reduziert. Cu<sup>1+</sup> bildet mit

Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Entsprechend kann die Absorption dieses Farbkomplexes bei 570 nm gemessen werden.

Zur Bestimmung des Proteingehalts des verdünnten Tumorcytosols wurden 50 µl in Mikrotiterplatten pipettiert und über Nacht mit 150 µl BCA-Reagenz von Pierce bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des Farbkomplexes bei 570 nm gemessen.

## 2.5 Knochenmarkaspiration



**Abbildung 6:** Punktionsstellen zur Knochenmarkaspiration. Beide Beckenkämme wurden im Rahmen der Knochenmarkbiopsie punktiert [45].

Die Knochenmarkaspiration an beiden Beckenkämmen wurde in Intubationsnarkose vor Beginn der Operation des Primärtumors durchgeführt. Um aseptische Punktionsbedingungen zu schaffen, wurde die Punktionsstelle mit ausreichend gefärbter kodan®-Tinktur forte und farbloser octeniderm®-Lösung desinfiziert. Nach kleiner Hautinzision wurde mit einer entsprechenden Knochenmarkaspirationsnadel der Beckenkamm punktiert. Eine Kontamination mit epithelialen Hautzellen konnte dadurch



verhindert werden. Das gewonnene Aspirat wurde in Heparin-beschichteten Röhrchen unverzüglich zur weiteren Aufarbeitung ins pathologische Institut gebracht.

Alle Patientinnen wurden vor der Punktion über etwaige Risiken wie Infektion und Blutung an den Punktionsstellen, Osteomyelitis, Verletzungen von angrenzenden Strukturen (z. B. Beckengefäße) ausführlich aufgeklärt. Für die Knochenmarkpunktion sowie die weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen wie sie in Kapitel 2.6 beschrieben werden, bestand eine schriftliche Einwilligung.

## 2.6 Bestimmung Cytokeratin-positiver Zellen aus dem Knochenmark

Die Bestimmung von Cytokeratin-positiven Zellen teilte sich prinzipiell in zwei Arbeitsgänge auf.

1. An Tag 1 wurde zur Herstellung eines *Cytospins* das entnommene Knochenmark aufbereitet und mehrmals zentrifugiert.
2. An Tag 2 erfolgte die eigentliche immunhistochemische Färbung mit Bindung des Cytokeratin-Antikörpers an die entsprechenden Bindungsstellen.  
Anschließend wurden Cytokeratin-positive Zellen mithilfe der APPAP-Methode sichtbar gemacht.

### Material und Lösungen

- Mouse Anti-Cytokeratin No. 18, monoclonal Antibody (Fa. Chemicon)
- AB-Serum (Fa. Biotest)
- Rabbit-Anti-Mouse IgG Brückenantikörper (Fa. Sigma)
- APAAP Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
- PBS-Puffer (10fach konzentriert), pH 7,6
- Neufuchsinsubstratlösung
- Objektträger SuperFrost 76x26 (Fa. Menzel)
- Markierstift DakoCytomation Pen (Fa. Dako)
- Deckgläser 24x32 (Fa. Menzel)
- Faltenfilter 595 ½
- Faltenfilter 593 ½
- Zytocentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen)
- Ficoll-Hypaque Lösung

- Erylysepuffer
- Aceton
- Variable Pipette, Bechergläser, Küvetten, Messzylinder, Glasflaschen, Trichter

### 2.6.1 Aufbereitung des Knochenmarks und Herstellung eines Cytospins

Das entnommene Knochenmark wurde zunächst zusammen mit PBS gewaschen. Dabei wurden circa 5 ml Knochenmark pro Röhrchen mit PBS aufgefüllt und anschließend für circa zehn Minuten ohne Bremse mit 180 g zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Fett und PBS wurden abpipettiert und verworfen. Im Anschluss wurde das Sediment mit PBS resuspendiert.

Schließlich wurden mononukleäre Zellen, welche die Cytokeratin-positive Zellfraktion enthielten, mithilfe der Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation (Dichte 1,077 g pro mol, 30 Minuten bei 900 g) isoliert. Dabei wurden in ein zweites Röhrchen circa 5 ml Ficolllösung vorgelegt und mit der Suspension aus dem ersten Röhrchen überschichtet. Nach der Zentrifugation erschienen die mononukleären Zellen unterhalb des roten Ringes (Interphase-Ring). Diese wurden abpipettiert, einem spitzkonischen Röhrchen zugeführt und nochmals mit 540 g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen.

Im Anschluss wurden circa 1 – 5 ml Erylysepuffer zum Zellsediment zugegeben. Die Einwirkzeit betrug fünf Minuten. Nach Auffüllen mit PBS wurde erneut bei 540 g für zehn Minuten ohne Bremse gewaschen und der Überstand entfernt.

Die Gesamtzellzahl der Suspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Gesamtvolumen wurde mit einer Pipette gemessen. Im abgenommenen Aspirationsvolumen sollten sich immer  $1 \times 10^6$  Zellen befinden.

Volumen (ml)	Zellzahl (n)
Gesamtvolumen (mit Pipette bestimmt)	Gesamtzellzahl (in der Neubauer-Zählkammer bestimmt)
Aspirationsvolumen (unbekannt x)	$1 \times 10^6$ Zellen

**Tabelle 6:** Berechnungsschema für das Aspirationsvolumen

Damit waren drei Größen einer Verhältnisgleichung vorhanden. Das Aspirationsvolumen, in dem sich exakt  $1 \times 10^6$  Zellen befanden, konnte einfach berechnet werden.

Es galt folgende Formel:

$$\text{Aspirationsvolumen (ml)} = 1 \times 10^6 \frac{\text{Gesamtvolumen (ml)}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Nachdem insgesamt vier Objektträger beschichtet wurden, wurde die vierfache Menge Aspirationsvolumen abgezogen, gleichermaßen auf vier Objektträger verteilt und in der Folge in einer Zytocentrifuge (Fa. Hettich) zentrifugiert (150 g für fünf Minuten). Auf einem Objektträger waren somit immer ungefähr eine Million Zellen vorhanden.

Anschließend ließ man die Präparate für einen Tag bei Raumtemperatur trocknen.

### 2.6.2 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin-positiven Zellen

Der Nachweis epithelialer Zellen im Cytospin erfolgte durch immunhistochemische Färbung mithilfe eines Antikörpers gegen Cytokeratin 18 [Clone CK18 (Clone CK2), 1:100; Fa. Chemicon, Hofheim, Germany]. Dieser Mausantikörper stellt einen IgG-Antikörper dar und bindet spezifisch an menschliches Cytokeratin No. 18.

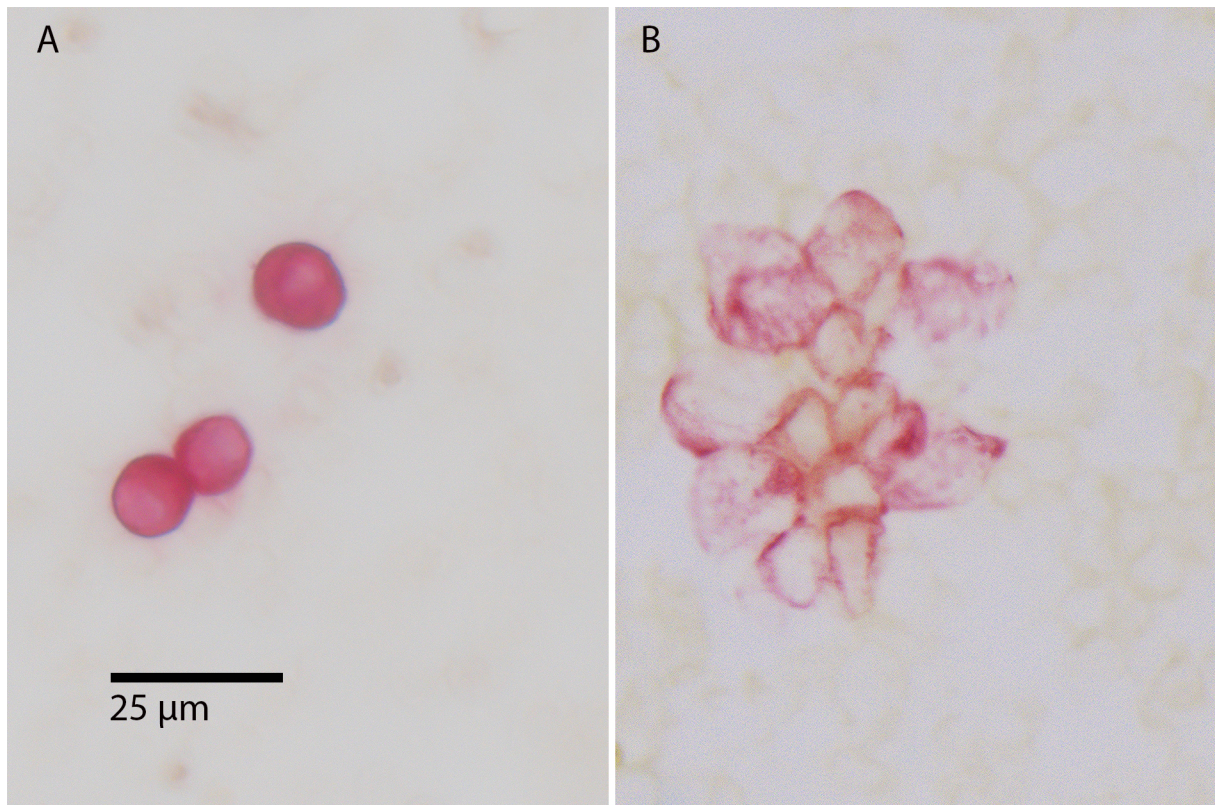
Zuvor wurden die über Nacht getrockneten Cytospins für zehn Minuten mit Aceton fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 200 µl AB-Serum/PBS (Verdünnung 1:10) blockiert.

Im Anschluss wurden 200 µl Antikörperlösung aufgetragen und die Objektträger für 45 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Antikörperbindung mithilfe der Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase- (APAAP-) Technik sichtbar gemacht. Auf die Objektträger wurden zunächst für 30 Minuten 200 µl Brückenantikörperlösung aufgetragen. Der Brückenantikörper band sowohl mit dem Primärantikörper als auch mit dem im Anschluss aufgetragenen APAAP-Komplex. Brückenantikörper wurden zudem im Überschuss zugefügt. Dadurch band nur eine Hälfte seines Fab-Fragments an den Primärantikörper. Die andere Hälfte blieb frei zur Bindung an den Antikörper des APAAP-Komplexes.

Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen und schließlich 200 µl APPAP-Lösung für 30 Minuten aufgetragen. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit Neufuchsinsubstratlösung in der Färbeküvette für

20 Minuten. Die Objektträger wurden daraufhin erneut mit PBS gewaschen und anschließend eingedeckelt.

Cytokeratin-positive Zellen wurden dann manuell durch eine erfahrene, spezialisierte, unabhängige Person bewertet. Alle positiven Fälle wurden durch einen Hämatonkologen bestätigt.



**Abbildung 7:** Positivfärbung von dCK+ Zellen (Antikörper: [Clone CK18 (Clone CK2), 1:100; Fa. Chemicon, Hofheim, Germany])

## 2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Sigma Plot 13.0 der Firma Systat Software Inc. [San Jose, USA]. Als statistischer Test wurde bzgl. der Abhängigkeit kategorialer Daten der Chi-Quadrat-Test zugrunde gelegt.

Für Überlebensanalysen wurde entweder der Logrank-Test oder der Gehan-Breslow-Test verwendet, zudem wurden Kaplan-Meier-Kurven errechnet.

Für Multivariantanalysen zur Bestimmung von krebsspezifischen Eigenschaften wurde die Cox-Regressionsmethode zugrunde gelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Datenüberblick

	Complete collection n = 480 (100%)	Positive dCK+ cells n = 110 (23%)	Negative dCK+ cells n = 370 (77%)	UPA pos. n = 220 (46%)	UPA neg n = 260 (54%)	PAI 1 pos. n = 326 (68%)	PAI 1 neg. n = 154 (32%)
<b>Age</b>							
< 51 years	115 (24%)	27 (25%)	88 (24%)	50 (23%)	65 (25%)	78 (24%)	37 (24%)
51 - 58 years	76 (16%)	19 (17%)	57 (15%)	39 (18%)	37 (14%)	50 (15%)	26 (17%)
59 - 66 years	129 (27%)	28 (25%)	101 (27%)	58 (26%)	71 (27%)	84 (26%)	45 (29%)
67 - 75 years	111 (23%)	25 (23%)	86 (23%)	51 (23%)	60 (23%)	78 (24%)	33 (21%)
> 75 years	49 (10%)	11 (10%)	38 (10%)	22 (10%)	27 (10%)	36 (11%)	13 (8%)
			<i>p=0.9 n.s.</i>		<i>p=0.8 n.s.</i>		<i>p=0.8 n.s.</i>
<b>T-Stage</b>							
pT1	244 (51%)	52 (47%)	192 (52%)	116 (53%)	128 (49%)	166 (51%)	78 (51%)
pT2	191 (40%)	45 (41%)	146 (39%)	88 (40%)	103 (40%)	133 (41%)	58 (38%)
pT3	33 (7%)	11 (10%)	22 (6%)	11 (5%)	22 (8%)	20 (6%)	13 (8%)
pT4	11 (2%)	1 (1%)	10 (3%)	4 (2%)	7 (3%)	7 (2%)	4 (3%)
unknown	1 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
			<i>p=0.1 n.s.</i>		<i>p=0.4 n.s.</i>		<i>p=0.5 n.s.</i>
<b>Grading</b>							
G1	45 (9%)	11 (10%)	34 (9%)	14 (6%)	31 (12%)	31 (10%)	14 (9%)
G2	275 (57%)	61 (55%)	214 (58%)	111 (50%)	164 (63%)	172 (53%)	103 (67%)
G3	157 (33%)	37 (34%)	120 (32%)	94 (43%)	63 (24%)	122 (37%)	35 (23%)
unknown	3 (1%)	1 (1%)	2 (1%)	1 (0%)	2 (1%)	1 (0%)	2 (1%)
			<i>p=0.9 n.s.</i>		<i>p&lt;0.001 sign.</i>		<i>p&lt;0.007 sign.</i>
<b>Node Status</b>							
pN0	249 (52%)	53 (48%)	196 (53%)	112 (51%)	137 (53%)	171 (52%)	78 (51%)
pN1	148 (31%)	30 (27%)	118 (32%)	73 (33%)	75 (29%)	103 (32%)	45 (29%)
pN2	47 (10%)	10 (9%)	37 (10%)	22 (10%)	25 (10%)	29 (9%)	18 (12%)
pN3	29 (6%)	15 (14%)	14 (4%)	10 (5%)	19 (7%)	19 (6%)	10 (6%)
unknown	7 (1%)	2 (2%)	5 (1%)	3 (1%)	4 (2%)	4 (1%)	3 (2%)
			<i>p&lt;0.005 sign.</i>		<i>p=0.6 n.s.</i>		<i>p=0.8 n.s.</i>
<b>UICC-stage</b>							
stage I	147 (31%)	33 (30%)	114 (31%)	61 (28%)	86 (33%)	95 (29%)	52 (34%)
stage IIA	167 (35%)	30 (27%)	137 (37%)	84 (38%)	83 (32%)	121 (37%)	46 (30%)
stage IIB	68 (14%)	15 (14%)	53 (14%)	32 (15%)	36 (14%)	45 (14%)	23 (15%)
stage IIIA	46 (10%)	10 (9%)	36 (10%)	22 (10%)	24 (9%)	29 (9%)	17 (11%)
stage IIIB	2 (0%)	1 (1%)	1 (0%)	0 (0%)	2 (1%)	2 (1%)	0 (0%)
stage IIIC	27 (6%)	11 (10%)	16 (4%)	9 (4%)	18 (7%)	17 (5%)	10 (6%)
stage IV	21 (4%)	9 (8%)	12 (3%)	11 (5%)	10 (4%)	16 (5%)	5 (3%)
unknown	2 (0%)	1 (1%)	1 (0%)	1 (0%)	1 (0%)	1 (0%)	1 (1%)
			<i>p=0.038 sign.*</i>		<i>p=0.352 n.s.*</i>		<i>p=0.437 n.s.*</i>
<b>Chemotherapy</b>							
yes	292 (61%)	66 (60%)	226 (61%)	149 (68%)	143 (55%)	211 (65%)	81 (53%)
no	144 (30%)	35 (32%)	109 (29%)	52 (24%)	92 (35%)	83 (25%)	61 (40%)
unknown	44 (9%)	9 (8%)	35 (9%)	19 (9%)	25 (10%)	32 (10%)	12 (8%)
			<i>p=0.7 n.s.</i>		<i>p&lt;0.01 sign.</i>		<i>p&lt;0.007 sign.</i>
<b>Estrogen</b>							
negative	57 (12%)	14 (13%)	43 (12%)	35 (16%)	22 (8%)	46 (14%)	11 (7%)
positive	419 (87%)	94 (85%)	325 (88%)	183 (83%)	236 (91%)	278 (85%)	141 (92%)
unknown	4 (1%)	2 (2%)	2 (1%)	2 (1%)	2 (1%)	2 (1%)	2 (1%)
			<i>p=0.4 n.s.</i>		<i>p=0.04 sign.</i>		<i>p=0.06 n.s.</i>
<b>Progesteron</b>							
negative	63 (13%)	15 (14%)	48 (13%)	40 (18%)	23 (9%)	52 (16%)	11 (7%)
positive	413 (86%)	93 (85%)	320 (86%)	178 (81%)	235 (90%)	272 (83%)	141 (92%)
unknown	4 (1%)	2 (2%)	2 (1%)	2 (1%)	2 (1%)	2 (1%)	2 (1%)
			<i>p=0.4 n.s.</i>		<i>p=0.01 sign.</i>		<i>p=0.023 sign.</i>
<b>HER2-Status</b>							
negative	362 (75%)	82 (75%)	280 (76%)	158 (72%)	204 (78%)	236 (72%)	126 (82%)
positive	107 (22%)	26 (24%)	81 (22%)	57 (26%)	50 (19%)	84 (26%)	23 (15%)
unknown	11 (2%)	2 (2%)	9 (2%)	5 (2%)	6 (2%)	6 (2%)	5 (3%)
			<i>p=0.8 n.s.</i>		<i>p=0.2 n.s.</i>		<i>p=0.022 sign.</i>

Tabelle 7: Klinisch-pathologische Charakteristika der Studienpopulation

Tabelle 7 beschreibt die Studienpopulation nach etablierten klinischen Parametern. Insgesamt wurden 480 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Der Beobachtungszeitraum lag zwischen 1999 und 2014 (für 80 % der Patientinnen zwischen 2003 und 2006).

Der Nachweis von dCK+ Zellen im Knochenmark war mit dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen signifikant verbunden ( $p=0,005$ ).

Beide Proteasen uPA und PAI-1 korrelierten mit dem Tumorgrading ( $p<0,001$  bzw.  $p<0,007$ ) und einem negativen Progesteronrezeptorstatus ( $p=0,01$  bzw.  $p=0,023$ ).

Zudem korrelierten uPA positive Fälle mit negativem Östrogenrezeptorstatus ( $p=0,04$ ), für PAI-1 konnte lediglich ein Trend, der allerdings keine Signifikanz erreichte, dokumentiert werden ( $p=0,06$ ). Außerdem bestand ein statistischer Zusammenhang zwischen HER2/neu-Status und PAI-1 ( $p=0,022$ ).

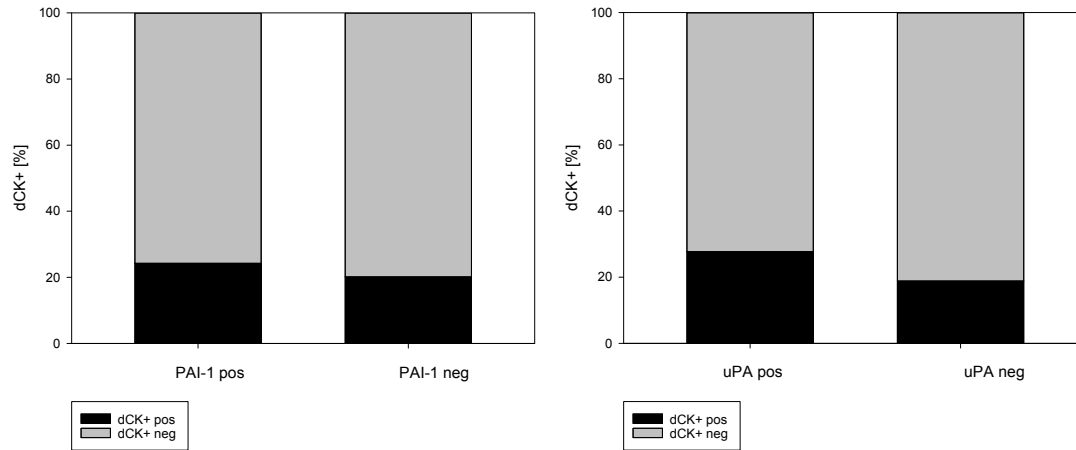
Patientinnen mit erhöhten uPA bzw. PAI-1 Spiegeln wurden in den meisten Fällen einer systemischen Chemotherapie zugeführt ( $p<0,01$  bzw.  $p=0,007$ ). In 52 bzw. 83 Fällen wurde trotz erhöhter uPA bzw. PAI-1 Tumorgewebekonzentration auf eine systemische Chemotherapie verzichtet.

Ausgehend von der Studienpopulation wurden diverse Subgruppenanalysen durchgeführt, die sich wie folgt aufteilten:

- 3.2 Untersuchungen am Gesamtkollektiv
- 3.3 Untersuchungen am Kollektiv ohne Chemotherapie (unabhängig vom Tumorstadium)
- 3.4 Untersuchungen am N0-Kollektiv (unabhängig vom Chemotherapiestatus)
- 3.5 Untersuchungen am N0-Kollektiv ohne Chemotherapie

### 3.2 Untersuchungen am Gesamtkollektiv

#### 3.2.1 Verteilung von dCK+ Zellen in Abhängigkeit von uPA/PAI-1

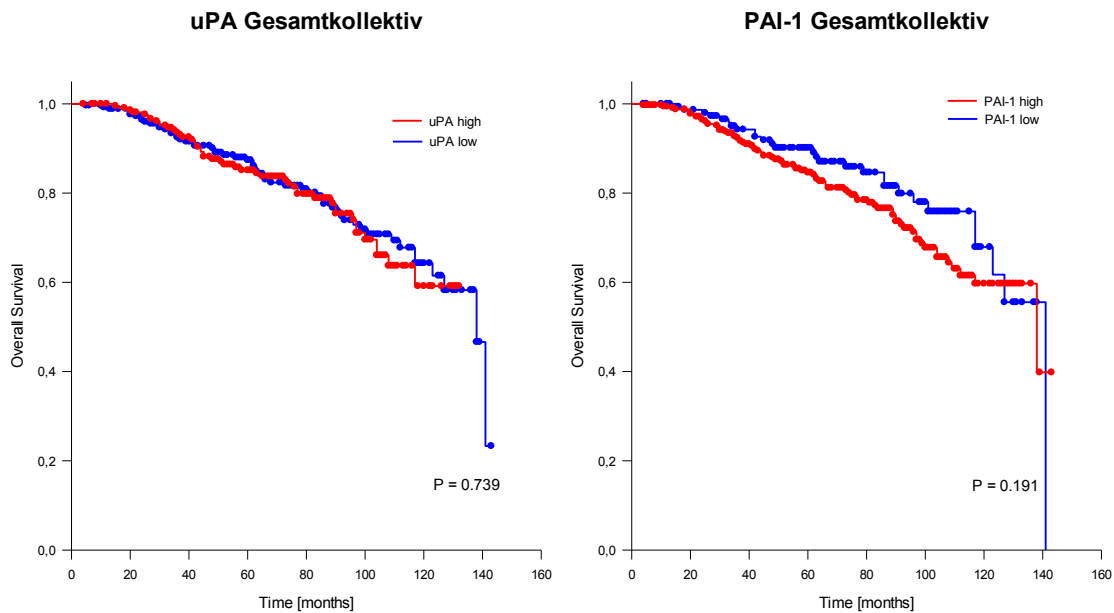


**Abbildung 8:** dCK+ in Abhängigkeit vom PAI-1 bzw. uPA-Status

In der Analyse des gesamten Kollektivs konnte eine positive Korrelation zwischen der uPA-Einstufung und dem Vorhandensein von dCK+ Zellen im Chi-Quadrat-Test identifiziert werden. Die dCK+-Rate lag bei 27,7 % im uPA positiven Kollektiv im Vergleich zu 18,8 % im uPA negativen Patientenkollektiv ( $p=0,028$ ).

Keine signifikante Korrelation, jedoch ein Trend, zeigte sich in der Analyse der PAI-1 Gewebekonzentration. Die dCK+-Rate lag hier bei 24,2 % für PAI-1 positives Tumorgewebe verglichen mit 20,1 % bei PAI-1 negativem Tumorgewebe ( $p=0,378$ ).

### 3.2.2 Kaplan-Meier für uPA/PAI-1 (Overall Survival)

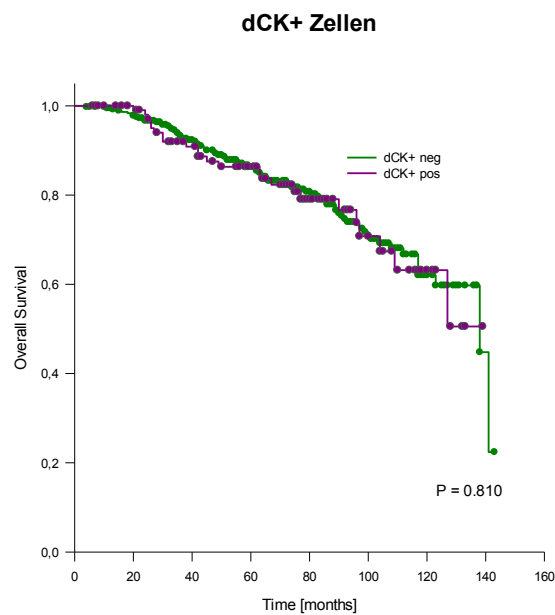


**Abbildung 9:** Überlebenszeit des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom uPA/PAI-1 Status

Beim Vergleich uPA-positive Patientinnen gegen uPA-negative Patientinnen konnte kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben identifiziert werden ( $p=0,739$ ). Auch in der PAI-1 positiven Kohorte stellte sich keine signifikante Diskrepanz im Overall Survival zur PAI-1 negativen Kohorte heraus ( $p=0,191$ ).



### 3.2.3 Kaplan-Meier für dCK+ Zellen (Overall Survival)

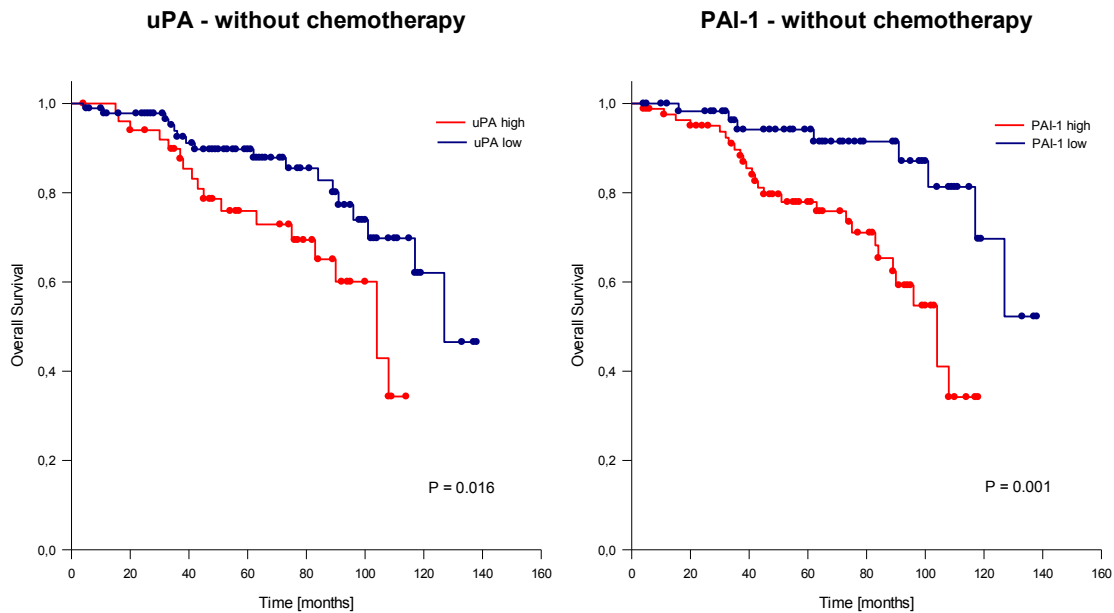


**Abbildung 10:** Überlebenszeit des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom Nachweis dCK+ im Knochenmark

In der Gruppe mit Nachweis von dCK+ positiven Zellen im Knochenmark konnte kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zum Kollektiv aus dCK+ negativen Zellen gefunden werden ( $p=0,810$ ). Der positive Nachweis von dCK+ Zellen erfolgte in 110 Fällen (23 %).

### 3.3 Untersuchungen am Kollektiv ohne Chemotherapie (unabhängig vom Tumorstadium)

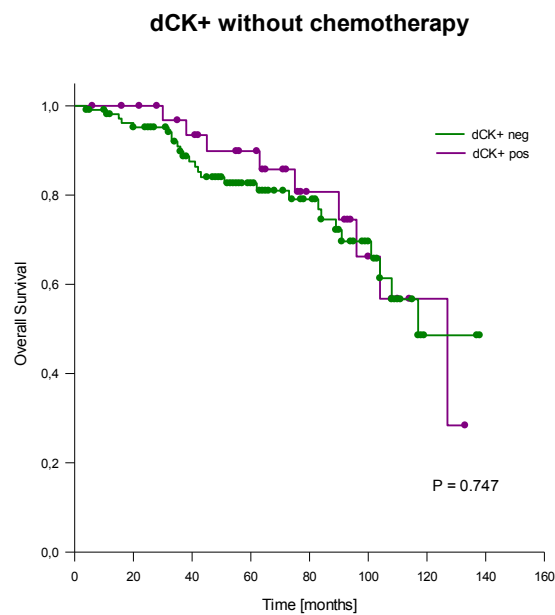
#### 3.3.1 Kaplan-Meier für uPA/PAI-1 (Overall Survival)



**Abbildung 11:** Überlebenszeit des Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit vom uPA/PAI-1 Status

Insgesamt haben 144 Patientinnen keine Chemotherapie erhalten. In der Analyse dieses Subkollektivs konnte ein signifikant schlechteres Überleben für PAI-1 positive Patientinnen ermittelt werden ( $p=0,001$ ). Für das uPA positive Kollektiv ohne Chemotherapie zeigte sich ebenfalls ein klarer Unterschied im Overall Survival, der auch Signifikanz erreichen konnte ( $p=0,016$ ).

### 3.3.2 Kaplan-Meier für dCK+ Zellen (Overall Survival)

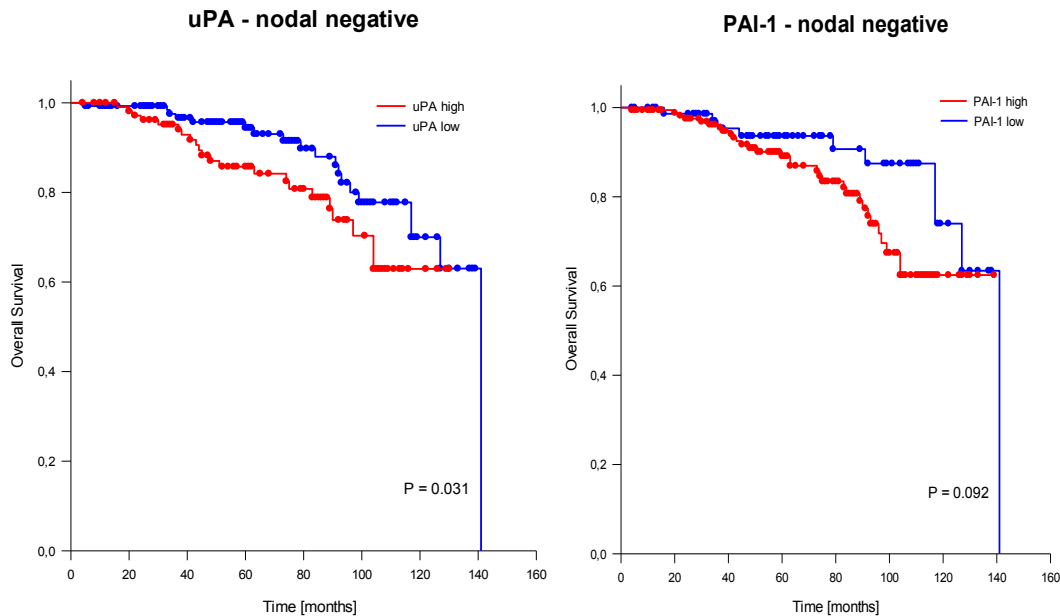


**Abbildung 12:** Überlebenszeit des Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit vom Nachweis dCK+ im Knochenmark

In den Fällen, die keine Chemotherapie erhalten hatten, waren die dCK+ Zellen nicht für das Gesamtüberleben prognostisch relevant. Es zeigte sich kein Unterschied mit nahezu identischen Kurven ( $p=0,747$ ).

### 3.4 Untersuchungen am N0-Kollektiv (unabhängig vom Chemotherapiestatus)

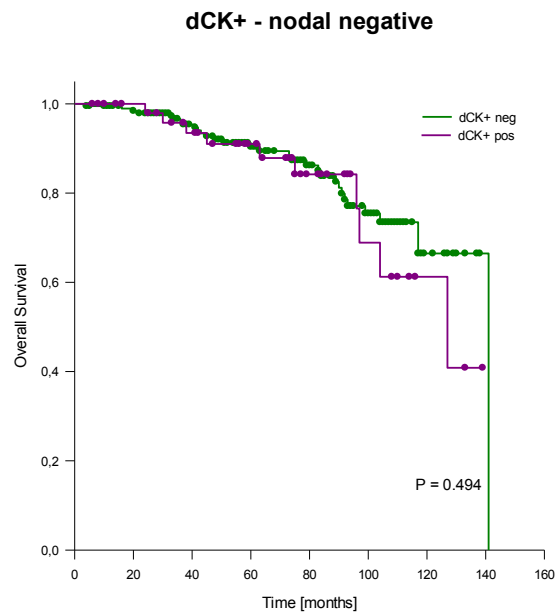
#### 3.4.1 Kaplan-Meier für uPA/PAI-1 (Overall Survival)



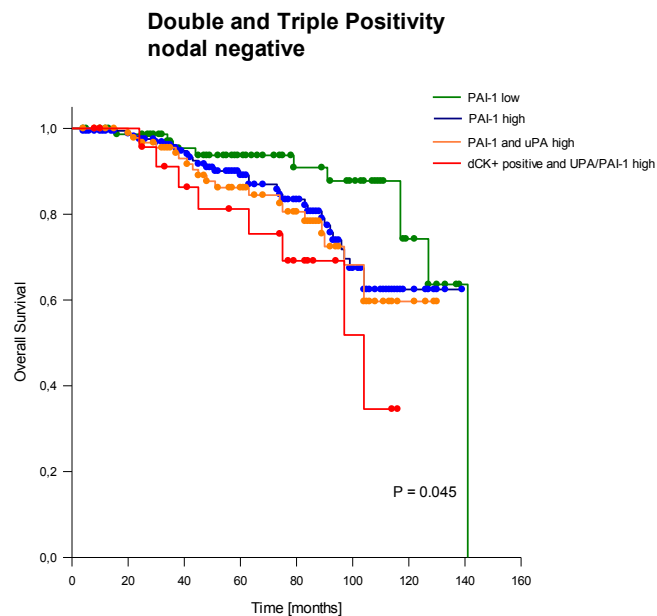
**Abbildung 13:** Überlebenszeit des N0-Kollektivs in Abhängigkeit vom uPA/PAI-1 Status

Das N0-Kollektiv umfasste insgesamt 249 Patientinnen. Es wurde erneut ein Trend im Gesamtüberleben für PAI-1 positive Fälle sichtbar mit einer mittleren Überlebenszeit von 115 (CI: 108 – 122 Monate) gegenüber 126 Monaten (CI: 117 – 135 Monate) ( $p=0,092$ ). Zudem zeigte sich ein knapp signifikanter Unterschied im Overall Survival bei uPA positiven gegenüber negativen Fällen im Gehan-Breslow-Test ( $p=0,031$ ). Beim Gehan-Breslow-Test werden Todesfälle, die sich am Anfang ereignen, stärker gewichtet. Der Gehan-Breslow-Test erfasst dadurch vor allem Unterschiede, die in der Nähe des Zeitpunktes Null liegen. Das mittlere Überleben lag in der uPA negativen Kohorte bei 123 Monaten (CI: 116 – 130 Monate) in der uPA positiven Kohorten bei 108 Monaten (CI: 100 – 116 Monate).

### 3.4.2 Kaplan-Meier für dCK+ Zellen (Overall Survival)



**Abbildung 14:** Überlebenszeit des N0-Kollektivs in Abhängigkeit vom Nachweis dCK+ im Knochenmark



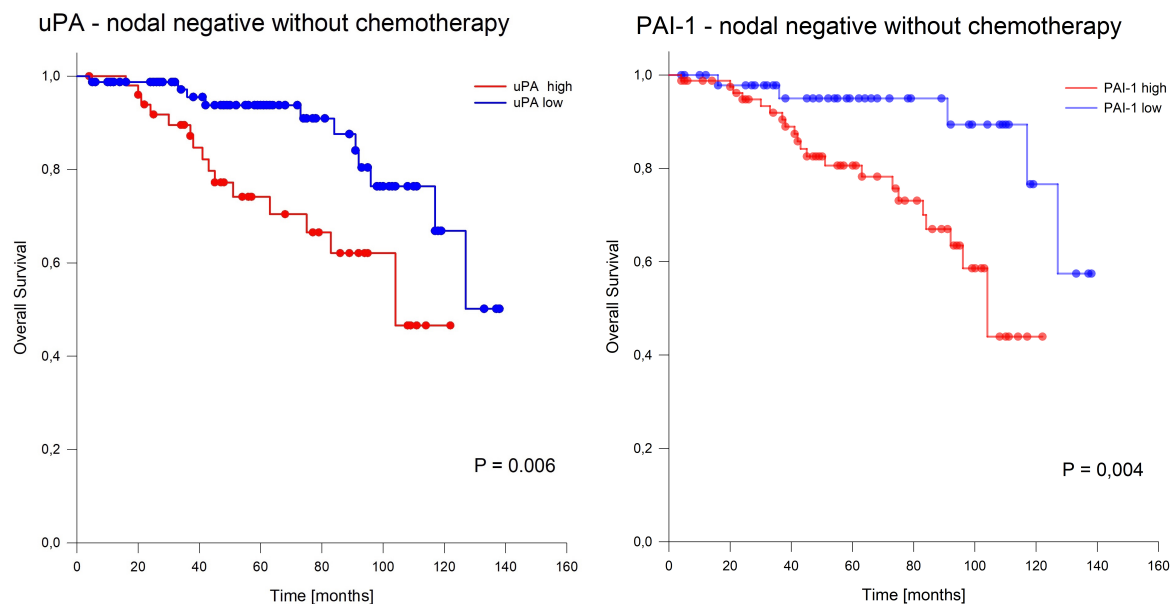
**Abbildung 15:** Überlebenszeit des N0-Kollektivs in Abhängigkeit vom PAI-1 Status, Double positivity (uPA+, PAI-1+) und Triple positivity (uPA+, PAI-1+, dCK+cells pos.)

Der Nachweis von dCK+ Zellen war im N0-Kollektiv nicht prognostisch relevant. Es zeigte sich keine Differenz im Overall Survival bei dCK+ positiven gegenüber dCK+

negativen Patientinnen ( $p=0,494$ ). Beim Vergleich des Gesamtüberlebens von PAI-1 negativen, PAI-1 positiven, PAI-1/uPA positiven (Double positive) und uPA/PAI-1/dCK+ positiven (Triple positive) Kohorten konnte mit einem mittleren Überleben von 126 Monaten (CI: 117 – 135 Monate), 115 Monaten (CI: 108 – 122 Monate), 107 Monaten (CI: 98 – 116 Monate) und 90 Monaten (CI: 75 – 105 Monate) ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p=0,045$ ).

### 3.5 Untersuchungen am N0-Kollektiv ohne Chemotherapie

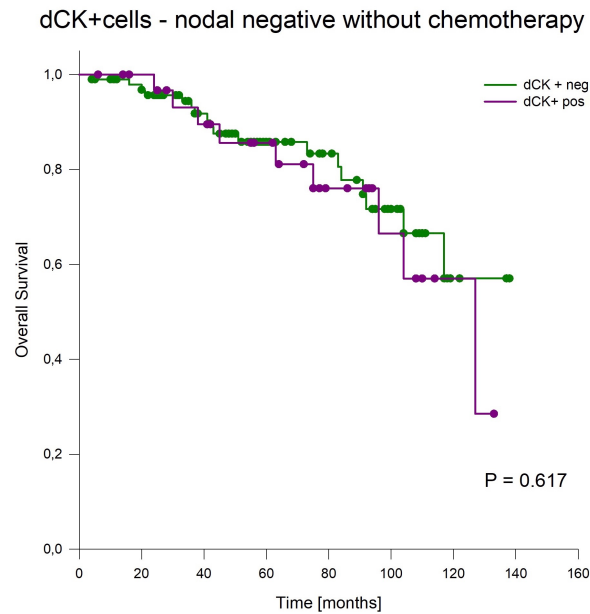
#### 3.5.1 Korrelation uPA zum Gesamtüberleben (Overall Survival)



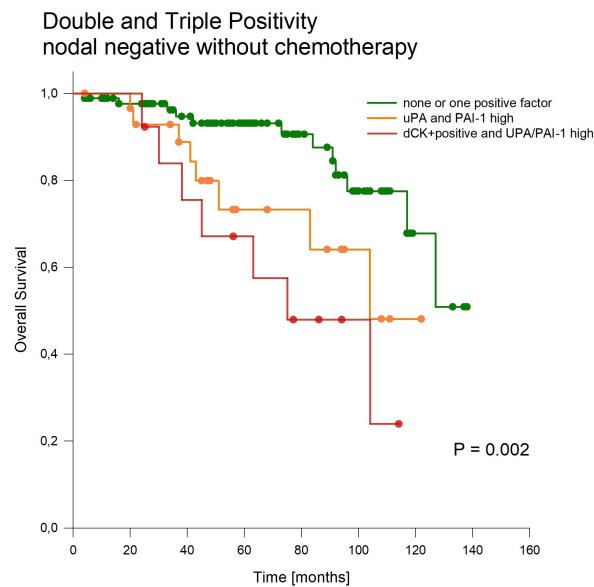
**Abbildung 16:** Überlebenszeit des N0-Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit vom uPA/PAI-1 Status

Im N0-Subkollektiv ohne Chemotherapie konnte für beide Proteasen ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben identifiziert werden. Für uPA positive Patientinnen lag das mittlere Überleben bei 91 Monaten (CI: 78 – 103 Monate) und damit deutlich schlechter als bei uPA negativen Patientinnen mit einem mittleren Überleben von 119 Monaten (CI: 108 – 129 Monate) ( $p=0,006$ ). Für PAI-1 ließ sich eine ähnlich signifikante Diskrepanz im Gesamtüberleben ermitteln. PAI-1 negative Patientinnen lebten im Mittel noch 125 Monate (CI: 114 – 136 Monate), wohingegen PAI-1 positive Patientinnen nur noch 94 Monate (CI: 84 – 103 Monate) lebten ( $p=0,004$ ).

### 3.5.2 Kaplan-Meier für dCK+ Zellen (Overall Survival)



**Abbildung 17:** Überlebenszeit des N0-Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit vom Nachweis dCK+ im Knochenmark



**Abbildung 18:** Überlebenszeit des N0-Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit von Double positivity (uPA+, PAI-1+) und Triple positivity (uPA+, PAI-1+, dCK+cells pos.)

Disseminierte CK+ Zellen waren in der N0-Subgruppe ohne Chemotherapie nicht prognostisch ausschlaggebend. Es zeigte sich ein mittleres Überleben für dCK+

positive Patientinnen von 104 Monaten (CI: 89 – 120 Monate) und für dCK+ negative von 112 Monaten (CI: 101 – 122 Monate) ( $p=0,617$ ).

Ein erheblicher signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben konnte für Triple positive (uPA, PAI-1, dCK+) Fälle gegenüber Fällen mit weniger als zwei positiven Faktoren beobachtet werden ( $p=0,002$ ). Das mittlere Überleben war mit 76 Monaten (CI: 56 – 98 Monate) bei Triple positiven Patientinnen deutlich schlechter als bei Patientinnen mit weniger als zwei positiven Faktoren und einem mittleren Überleben von 114 Monaten (CI: 105 – 123 Monate).

In einer Multivariantanalyse, bestehend aus uPA, PAI-1, dCK+ Zellen, Tumorgröße und Grading, wurden die Tumorgröße (HR: 3,4; CI: 1,6 – 7,2) und Triplepositivität (HR: 9,3; CI: 1,1 – 75) als unabhängige prognostische Parameter identifiziert.



## 4. Diskussion

### 4.1 Methodische Aspekte

#### 4.1.1 Bestimmung Cytokeratin-positiver Zellen

Zur Identifizierung von Cytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark wurde eine immunhistochemische Methode unter Zuhilfenahme eines monoklonalen Antikörpers gegen Cytokeratin 18 [Clone CK18 (Clone CK2), 1:100; Fa. Chemicon, Hofheim, Germany] angewandt, welche zur Detektion epithelialer Zellen im Knochenmark bereits durch mehrere Studien validiert wurde [31,46]. In unserer Studie lag die Prävalenz epithelialer Zellen bei 22,9 %. Damit befindet sich die Positivrate in dem Bereich, welcher auch in der Literatur publiziert ist [31]. In den meisten Studien wird Cytokeratin als Zielantigen verwendet. Grundsätzlich sind zu dessen Detektion verschiedene Antikörper (A45-B/B3, CK2, AE1/AE3) vorhanden, die aber alle durch die morphologische Klassifikation von positiven Zellen eine hohe Spezifität im Nachweis von epithelialen Zellen im Knochenmark besitzen [47].

Prinzipiell besteht zur Beurteilung der Ausbreitung von Mikrometastasen neben immunhistochemischen Methoden eine Vielzahl anderer Methoden:

- Immunomagnetic bead enrichment
- RT-PCR
- Fluorescence in situ Hybridization

Gerade *immunomagnetic bead enrichment* bietet einige Vorteile. Das Verfahren zeichnet sich durch eine leichte Reproduzierbarkeit sowie den geringen zeitlichen Aufwand (weniger als eine Stunde) aus [48]. Zudem ist es durch eine hohe Spezifität in der Lage weniger als zehn Tumorzellen unter 50 Millionen Knochenmarkszellen zu erkennen. Ein Nachteil der Methode besteht allerdings darin, dass manche hämatopoetischen Zellen in der Lage sind, EpCam-Antigen zu exprimieren und damit die angereicherte Fraktion kontaminieren können. Außerdem kann während der

epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) ein transienter Rückgang der EpCam-Expression nachgewiesen werden. EMT spielt im metastatischen Prozess eine entscheidende Rolle sowohl während der Migration als auch in der frühen Postmigrationsphase [44,49].

Das Prinzip der RT-PCR besteht darin, genetische Änderungen, die typisch sind für Krebszellen, nachzuweisen und zu identifizieren. RT-PCR ist sicherlich ein sensitiveres Verfahren zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen als die immunhistochemischen Verfahren. Es besteht jedoch eine starke Beeinträchtigung durch falsch positive Proben. Eine niedrige Expression der Zielantigene bzw. der mRNA-Abschrift (von z. B. Cytokeratin 8/19/20, Carcinoembryonales Antigen oder HER2) konnte bei gesunden Freiwilligen wie auch bei Patienten mit hämatologischen Malignomen gezeigt werden [50]. Als Ursache dieser unerlaubten Expression von Zielgenen in intakten Zellen konnte unter anderem eine gesteigerte inflammatorische Aktivität identifiziert werden. Des Weiteren konnten die Gegenwart von Pseudogenen oder eine Kontamination der Proben ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen führen [50].

Die niedrige Spezifität lässt sich durch den Einsatz von Multimarker-RT-PCR erhöhen, wie Gilje et al. zeigen konnten [51]. Ein Vorteil der Methode nach Gilje besteht ganz offensichtlich darin, dass mehrere Marker, Keratin 19 (KRT19), TWIST1 und mammaglobin A (hMAM) verwendet wurden. Mit dem Nachweis des TWIST1-Zielgens ist zudem ein Marker für die epitheliale-mesenchymale Transition vorhanden. Aufgrund der Tatsache, dass eine relativ geringe Übereinstimmung bzgl. des positiven DTC-Status zwischen den beiden Methoden besteht, sollten sie eher als gegenseitig ergänzend betrachtet werden [51].

DTC-assoziierte Genüberexpression wie z. B. von erbB2 oder int2 kann zudem mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nachgewiesen werden. Dadurch erhalten disseminierte Tumorzellen eine zusätzliche Charakterisierung, welche in einigen Studien sehr vielversprechend beschrieben wird [52].

Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen diene zunächst das Knochenmarkkompartiment, jedoch gelangten mit der Zeit auch andere Kompartimente zur Identifizierung von mikrometastatischen Tumorzellen beim primären Mammakarzinom, wie das periphere Blut, in den Fokus der Wissenschaft. Rein

technisch gesehen bietet das Blut zahlreiche Vorteile gegenüber Knochenmarkaspirationen. Eine Blutabnahme stellt eine sehr wenig invasive und wenig schmerzhaft Methode dar, die in regelmäßigen Abständen wiederholt werden kann. Eine Aussage über das Ausheilen oder die Gefahr, Mikrometastasen zu entwickeln, kann somit zu mehreren Zeitpunkten getroffen werden. Zudem konnte mit der Entwicklung und Etablierung des CellSearch®-Systems eine unkomplizierte – weil weitgehend automatisierte – und gut reproduzierbare Methode zur Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen zur Verfügung gestellt werden [53].

Dennoch wird die Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen weiterhin kontrovers diskutiert. Die Dissemination von Krebszellen in die Blutbahn entspricht lediglich dem ersten Schritt im Prozess zur Metastase [54]. Ob diese Zellen zur Migration oder zur epithelial-mesenchymalen Transition befähigt sind, was als zwei wesentliche Voraussetzungen zur Ausbildung von Metastasen angesehen wird, bleibt letztlich derzeit noch unklar.

Disseminierte Cytokeratin-positive Zellen im Knochenmark sind den Schritt der Migration bereits gegangen und verfügen deshalb über ein hohes diagnostisches und prognostisches Gewicht [31,55]. Letztlich ist noch unklar, ob die nachgewiesenen Zellen auch in der Lage sind die epithelial-mesenchymale Transition zu vollziehen und Metastasen auszubilden. Zudem konnten Franzen et al. zeigen, dass es im Verlauf der Entwicklung zu manifesten, malignen Tumorzellen bei Brustkrebs zum Rückgang der Cytokeratinspiegel kommt [56]. Deshalb sollte man es vermeiden Cytokeratin-positive Zellen als Tumorzellen zu bezeichnen. Die immunhistochemische Bestimmung von Cytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark stellt dennoch immer noch eine angemessene und schließlich auch eine häufig angewandte Methode zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen dar. Sie verfügt darüber hinaus über lange Follow-up-Daten.

#### 4.1.2 Bestimmung uPA/PAI-1

Die Bestimmung der uPA/PAI-1 Gewebekonzentrationen mithilfe des ELISA-Tests stellt gemäß des Quality Assurance Center in Nijmegen [57] eine gute Methode zur genauen Quantifizierung dar. Zudem haben die Qualitätsdaten der *European Organization for*

*Research and Treatment of Cancer (EORTC) Receptor and Biomarker Study Group* [58] gezeigt, dass der ELISA-Test gut im klinischen Routinebetrieb einsetzbar ist. Prinzipiell bestehen derzeit zwei Methoden zur Gewebeaufschlüsselung. Das mit Triton X-100 behandelte Gewebe steht der Triton-freien Cytosolfraction gegenüber. Bei beiden Extraktionsarten ergeben sich unterschiedliche Cut-off Werte. Die Tatsache, dass die prognostische Information des uPA bei der Tritonfraction höher ist als im Tumorcytosol [59,60] wurde als ausschlaggebender Grund zur Verwendung der Triton-Methode herangezogen.

Als Alternativmethoden zur Bestimmung der uPA/PAI-1 Gewebekonzentrationen sind aktuell zwei Verfahren vorhanden:

- Quantitative RT-PCR
- Immunhistochemische Methode

Bei der quantitativen RT-PCR wird der Gehalt von uPA/PAI-1 mRNA im Tumorgewebe bestimmt. Dabei wird durch genspezifische Primer (basierend auf der cDNA-Sequenz für uPA bzw. PAI-1) ein Amplifikationsprogramm gestartet. Während mehrerer Amplifikationszyklen kann die Anzahl der Kopien mithilfe z. B. der LightCycler Technologie bestimmt werden.

Vorteile des Verfahrens liegen sicherlich in der guten Reproduzierbarkeit und dem zeitlich geringen Aufwand. Jedoch haben mehrere Studien gezeigt, dass die Bestimmung der uPA/PAI-1 mRNA nur unzureichend mit der exakten Bestimmung der uPA/PAI-1 Gewebekonzentrationen im ELISA korreliert [61,62,63]. Als Gründe hierfür kommen am ehesten posttranskriptionale Regulationsprozesse in Frage, welche durch Nagamine et al. beschrieben werden. So wird die Stabilität der uPA-mRNA durch mehrere andere Einflüsse ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\alpha_v$  integrin,  $\text{TNF } \alpha$ , Glucocorticoide) posttranskriptionell moduliert [64]. Ähnliches gilt für PAI-1 mRNA, deren Stabilität durch Cytokine, growth factors und Hormone beeinflusst wird. In der Summe kann man also sagen, dass die mRNA-Stabilität dynamisch und zellspezifisch ist [64].

Da immunhistochemische Verfahren z. T. mithilfe von Antikörpern, welche auch bei der ELISA-Bestimmung zur Anwendung kommen, durchgeführt werden, ist es naheliegend,

dass eine Korrelation zwischen beiden Verfahren besteht. Eine signifikante Korrelation zwischen IHC Scores und den ELISA-Gewebekonzentrationen wurde für uPA und PAI-1 bei Brustkrebs gefunden [65,66]. ELISA-Methoden werden aufgrund ihrer nachgewiesenen klinischen Relevanz, unmissverständlichen Interpretation und anhaltender Qualitätssicherungsprogramme bevorzugt [65].

Zusammenfassend kann man an der uPA/PAI-1 Bestimmung mithilfe des ELISA-Tests kritisieren, dass zur adäquaten Beurteilung eine angemessene Menge an gefrorenem Tumormaterial vorhanden sein muss. Da in unserer Studie stets ausreichende Mengen entnommen wurden und zudem eine lückenlose Kühlkette von der Gewebeentnahme bis zur Bestimmung der Proteasenkonzentration gewährleistet war, stellte die ELISA-Methode zur uPA/PAI-1 Bestimmung im Cytosolextrakt sicherlich eine verlässliche und gut etablierte Methode mit hoher klinischer Aussagekraft dar [18].

#### 4.2 Zusammenhang zwischen uPA und Cytokeratin-positiven Zellen

Da uPA in der proteolytischen Kaskade zur Umstrukturierung der extrazellulären Matrix eine Schlüsselrolle einnimmt, ist es nicht verwunderlich, dass dessen Nachweis auch zu einem erhöhten Nachweis von Cytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark führt. Tatsächlich war in uPA positiven Fällen der Nachweis von Cytokeratin-positiven Zellen signifikant höher (18,8 % vs. 27,7 %) und konnte im Chi-Quadrat-Test statistisch wiedergegeben werden ( $p=0,028$ ).

Als Ausdruck einer gesteigerten Migrations- bzw. Disseminationsfähigkeit von uPA positiven Zellen bei Brustkrebs finden sich also vermehrt Cytokeratin-positive Zellen im Knochenmark.

Nur wenige Studien haben sich bisher dem Zusammenhang zwischen uPA und DTCs gewidmet [20,67]. Mego et al. berichten über einen positiven Zusammenhang von uPA und dem Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut [20]. Diese Beobachtung steht daher im Einklang mit unseren Ergebnissen, da wir einen Zusammenhang zwischen uPA und der Anwesenheit von disseminierten Cytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark bei Brustkrebs gefunden haben. Ebenfalls im Einklang mit unseren Ergebnissen befinden sich die Ergebnisse von Thomas et al. [67]. Ein positiver Zusammenhang konnte hierbei durch zweifache immunhistochemische

Färbung zwischen uPA und Cytokeratin 8/18 auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark beim Prostatakarzinom gefunden werden.

#### 4.3 Fehlender statistischer Zusammenhang zwischen PAI-1 und Cytokeratin-positiven Zellen

Eine ähnliche Tendenz wurde auch für PAI-1 gefunden, aber deutlich abgeschwächt (20,1 % vs. 24,2 %). Im Chi-Quadrat-Test konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang mehr zwischen PAI-1 in der Gewebeprobe und dem Vorhandensein Cytokeratin-positiver Zellen in der Knochenmarkpunktion gezeigt werden ( $p=0,378$ ). Dieser Umstand überrascht zunächst. Stellt PAI-1 für sich alleine doch einen Parameter dar, der eine gesteigerte Adhäsions- und Migrationsfähigkeit von Zellen charakterisiert und zudem auch am programmierten Zelltod beteiligt ist [16]. Es wäre somit eigentlich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem gesteigerten Nachweis von disseminierten Tumorzellen und PAI-1 im Tumorcytosol zu erwarten gewesen. Letztlich bleibt nur zu vermuten, ob bei einer größeren statistischen Power mit entsprechend größerem Patientenkollektiv dieser Zusammenhang ebenfalls signifikant geworden wäre.

Jedoch sollte in einer kritischen Auseinandersetzung nicht unerwähnt bleiben, dass eine erhöhte PAI-1-Expression wohl auch in der Lage ist, die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Brustkrebs- und Ovarialkrebszellen zu reduzieren [68]. Letztlich stellt die Einnistung von zirkulierenden Tumorzellen in eine neue Mikroumgebung einen komplizierten Vorgang dar, der mit der Bestimmung zweier Werte wahrscheinlich nur unzureichend repräsentiert wird, da selbst im Proteasensystem mehrere Vorgänge komplex miteinander interagieren.

#### 4.4 Effekte von uPA/PAI-1 und Cytokeratin-positiven Zellen auf das Gesamtüberleben (Overall Survival)

In den Kaplan-Maier-Kurven zeigte sich kein signifikant verlängertes bzw. verkürztes Überleben im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von uPA/PAI-1 positivem Gewebe oder Cytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark.

Insbesondere das Overall Survival in der Cytokeratin-positiven Gruppe unterscheidet sich nicht vom Überleben der Patientinnen ohne Nachweis von Cytokeratin-positiven Zellen. Damit steht es im Widerspruch zu den Ergebnissen von S. Braun et al. [31]. Als Kritikpunkt der Studie von Braun et al. muss sicherlich betrachtet werden, dass unterschiedliche Nachweismethoden für Mikrometastasen im Knochenmark in unterschiedlichen Zentren verwendet wurden. Allerdings verfügt die Studie im Gegensatz zu den hier ermittelten Daten über weit mehr Patientinnen (n=4703 vs. n=480).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Studien ergibt sich in der Betrachtung der Studienpopulation. Während sich bei Braun et al. nur 36 % der Patientinnen (1596 + 119 von 4703) einer systemischen Chemotherapie unterzogen haben, waren es in unserer Studienpopulation circa 61 % (292 von 480 Patientinnen).

Daher liegt es nahe, dass durch den vermehrten Einsatz einer systemischen Chemotherapie auch die Effekte eines vermehrten Vorkommens von Mikrometastasen und disseminierten Tumorzellen auf das Overall Survival verwaschen werden und sich damit die Gruppen nicht mehr signifikant voneinander unterscheiden.

Vergleichbares gilt für den fehlenden Unterschied von uPA/PAI-1 positivem vs. negativem Gewebe im Overall Survival. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass durch den vermehrten Einsatz von systemischer Chemotherapie vorhandene Effekte unter Umständen maskiert vorliegen. Zumindest ist bei Betrachtung der Kurven ein Trend erkennbar, der auf ein vermindertes Überleben von PAI-1 positiven Patientinnen hindeutet.

Um diese These zu stützen, wurden zudem Kaplan-Maier-Kurven für das Patientenkollektiv ohne Chemotherapie erstellt. Für uPA/PAI-1 konnte ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben verifiziert werden, was (zusammen mit dem fehlenden Unterschied im Gesamtkollektiv) die These stützt, dass uPA/PAI-1 als Prädiktoren für das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie betrachtet werden sollten; ein Sachverhalt, der im Einklang mit der vorhandenen Literatur steht [27]. Nichtsdestotrotz konnte im Kollektiv ohne Chemotherapie kein Unterschied im Gesamtüberleben beim Nachweis von dCK+ belegt werden.

Eine Erklärung bieten unter Umständen Balic et al. [69]. Obwohl der Nachweis von dCK+ Zellen bei Braun et al. [31] mit einer schlechten Prognose einherging, zeigte sich in dieser Studie aber auch ein nicht unerheblicher Anteil von Patientinnen, der dennoch

ein gutes Überleben hatte [69]. Disseminierte Tumorzellen liegen dann am ehesten als schlafende Zellen vor und sind in der Lage eine Wiederkehr des Tumors erst nach vielen Jahren zu evozieren [69]. Maßgeblich an der Progression zur Tumorzelle ist neben der Existenz von dCK+ Zellen eben auch die Mikroumgebung beteiligt [69].

#### 4.5 N0-Patientenkollektiv

Die Bedeutung der Proteasen uPA/PAI-1 wird in der Literatur und in der klinischen Therapieentscheidung vor allem bei Patientinnen mit nodalnegativem Lymphknotenstatus sehr hoch bewertet. Patientinnen mit hohen uPA/PAI-1 Spiegeln sollten trotz nodalnegativem Lymphknotenstatus einer systemischen Chemotherapie zugeführt werden. Umgekehrt erreichen Patientinnen mit niedrigen uPA/PAI-1 Gewebekonzentrationen im ELISA auch ohne adjuvante Chemotherapie ein gutes tumorfreies Langzeitüberleben [26]. UPA/PAI-1 stellen unabhängige Prognose- und Risikofaktoren dar und können in die Therapieentscheidung bzgl. einer adjuvanten Chemotherapie beim N0-Mammakarzinom mit einfließen [28]. In der aktuellen ASCO-Leitlinie wird die Testung auf uPA/PAI-1 vor allem beim nodalnegativen, endokrin sensitiven und HER2-negativen G2-Mammakarzinom empfohlen [28].

Das Hauptziel dieser Arbeit war es nicht diese These erneut zu bestätigen. In unserem N0-Kollektiv war ein klarer Trend bei uPA ( $p=0,031$ ) und PAI-1 positivem Tumorgewebe ( $p=0,092$ ) beim Overall Survival zu beobachten, der allerdings für PAI-1 keine Signifikanz erreichte. Letztlich waren im N0-Subkollektiv, das keine Chemotherapie erhalten hatte, diese Effekte deutlich stärker ausgeprägt. Ein positiver Nachweis von uPA ( $p=0,006$ ) oder PAI-1 ( $p=0,004$ ) im Tumorgewebe wirkte sich signifikant auf das jeweilige Gesamtüberleben aus. Unsere Beobachtungen decken sich folglich mit der vorhandenen Literatur [70] und stützen erneut die Darstellung von Harbeck et al., dass uPA/PAI-1 positive Mammakarzinome besser auf eine adjuvante Chemotherapie ansprechen [27].

Der alleinige Nachweis von Cytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark erbrachte allerdings in der N0-Gruppe keinen signifikanten Unterschied im Overall Survival. Auch im Subkollektiv N0 ohne Chemotherapie konnte keine relevante Abweichung im Gesamtüberleben dokumentiert werden. Demnach steht diese Beobachtung im Widerspruch zu diversen Studien, welche ebenfalls immunhistochemische Verfahren



zum Nachweis von Mikrometastasen verwendeten [29,31]. Gründe hierfür liegen unter Umständen im unterschiedlich gewählten Endpunkt. Während andere Studien tumorfreies oder tumorspezifisches Überleben als Endpunkt definierten, haben wir Overall Survival gewählt.

Kamen zusätzlich Faktoren hinzu, die in der Lage sind, Migration und Metastasenbildung zu beeinflussen (z. B. uPA/PAI-1 Nachweis im Tumorgewebe), zeigte sich beim Overall Survival unter Beisein von disseminierten Zellen ein deutlicher synergistischer Effekt. Für Triple positive (uPA+, PAI-1+, dCK+) Patientinnen konnte im N0-Kollektiv sowohl mit als auch ohne systemische Chemotherapie ein signifikant schlechteres Überleben belegt werden. Unsere Untersuchungen legen demnach nahe, dass uPA/PAI-1 nicht nur in der Lage sind, die Migration von Zellen ins Blut zu unterstützen, sondern darüber hinaus über diverse Effekte das Wachstum von Tumorzellen und die Ausbildung von Metastasen zu erleichtern und somit das Gesamtüberleben signifikant zu verschlechtern (Abbildung 15 und Abbildung 18). Angiogeneseförderung und Inhibition von Apoptose durch PAI-1 [25], Abbau der extrazellulären Matrix, durch Fibrin induzierter Schutz von Tumorzellen durch das Immunsystem (Anmerkung: PAI-1 hemmt die Fibrinolyse und begünstigt dadurch metastatisches Wachstum [71,72]) sowie mitogene Wirkungen von uPA/PAI-1 [71] stellen hierbei die wichtigsten in der Literatur beschriebenen prometastatischen Wirkungen des uPA/PAI-1 Systems fernab des Primärtumors dar. Der Umstand, dass in unserem N0-Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom Vorhandensein oder Fehlen von dCK+ Zellen kein Unterschied im Overall Survival festzustellen war, jedoch bei Triple positiven Fällen sich das Überleben gravierend verschlechterte, stützt die Behauptung, dass uPA/PAI-1 Proteasen nicht nur Effekte auf Migration und Dissemination haben, sondern auch in der Lage sind, für disseminierte Tumorzellen ein optimales Milieu zur Metastasenbildung zu schaffen und damit das Outcome des Patienten zu verschlechtern.

## 5. Zusammenfassung

Bereits bekannte Effekte des uPA/PAI-1 Proteasensystems, wie der hohe prädiktive Wert für das Ansprechen einer adjuvanten Chemotherapie konnten auch in unserer Analyse bestätigt werden [27].

Unsere Untersuchungen belegen zudem, dass eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von uPA und dem Nachweis von dCK+ Zellen im Knochenmark besteht. UPA erleichtert Dissemination und Migration. Inwieweit diese Zellen zur Ausbildung von manifesten Metastasen befähigt sind, bleibt letztlich unvorhersehbar und bedarf weiterer Forschung und klinischer Studien.

Der alleinige Nachweis von dCK+ Zellen im Knochenmark erbrachte in dieser retrospektiven Studie weder im Gesamtkollektiv noch im N0-Kollektiv einen signifikanten Effekt auf den Krankheitsverlauf. Auch nach Abzug der Effekte durch eine adjuvante Chemotherapie konnte eine Verschiedenheit im Gesamtüberleben in den Kollektiven mit und ohne Nachweis von dCK+ Zellen nicht nachgewiesen werden.

Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bei Brustkrebs wurden zu großen Anteilen als Krebsstammzellen identifiziert und können demnach einer systemischen Chemotherapie widerstehen und noch nach Jahren einen Rückfall verursachen [69].

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass gerade Patientinnen mit Triplepositivität (uPA+, PAI-1+, dCK+) ein signifikant schlechteres Überleben im N0-Kollektiv aufweisen. Das Vorhandensein von uPA/PAI-1 im Tumorgewebe ist also unter Umständen in der Lage eine „Wohlfühlatmosphäre“ („homing factor“) für Krebsstammzellen zu schaffen und damit ein schlechteres Gesamtüberleben zu verschulden.

Zielgerichtete Therapien gegen uPA/PAI-1 könnten ein interessanter Gegenstand zur Verbesserung der Prognose beim invasiven Mammakarzinom werden. Eine dadurch erzeugte für Tumorzellen ungünstige Mikroumgebung für Zellwachstum und -migration wäre die Folge.

Ausblicke zur zielgerichteten Therapie gegen uPA/PAI-1 finden sich bereits in der Literatur [60]. Antisense Oligonukleotide oder siRNA (small interfering RNA) sind in der Lage, das uPA Gen zum Schweigen zu bringen. Zudem bestehen Antikörper gegen uPA oder uPA-R, welche die Bindung von uPA am uPA-Rezeptor verhindern können.

Zur Etablierung einer zielgerichteten Therapie bedarf es allerdings noch weiterer intensiver Forschung.

Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark stehen aufgrund ihrer Tumorstammzeleigenschaften [69] weiterhin im Verdacht als Reservoir für metastatische Ausbreitung zu fungieren. Nachdem Tumorstammzellen sich in der G0-Phase befinden, können sie sich einer systemischen Chemotherapie entziehen. Das Schicksal dieser Zellen kann mit großer Wahrscheinlichkeit das Outcome der Patientinnen bestimmen [69]. Deren Bestimmung ist unter Umständen ein vielversprechendes Hilfsmittel zur Vorhersage eines krankheitsfreien Überlebens beim frühen Brustkrebs [73].

## 6. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bruno Märkl für die Überlassung des Themas und die hervorragende und zuverlässige Betreuung während aller Phasen in der Entstehung dieser Doktorarbeit. Ohne sie wäre diese Dissertation nicht fertig geworden.

Der größte Teil der labortechnischen Routineaufbereitung wurde von MTA Frau Carmen Sailer und MTA Frau Monika Hallabrin geleistet.

Herr Gerhard Schenkirsch hat über das Tumorzentrum Augsburg maßgeblich an der Datenerhebung mitgewirkt. Ihrem gewissenhaften Einsatz gilt meine besondere Anerkennung.

Ich danke Herrn Bernhard Berchtenbreiter für die konstruktive Kritik und die zahlreichen Verbesserungsvorschläge.

Meiner Frau Katharina, die mich während meiner Facharztausbildung und bei der Erstellung dieser Doktorarbeit unermüdlich unterstützte, gilt besonderer Dank.

Zudem gilt mein größter Dank meinen Eltern für ihre Motivation und Unterstützung. Nicht nur während der Anfertigung dieser Doktorarbeit, sondern während meines gesamten Lebens standen sie mir beständig zur Seite. Ohne sie wären meine beruflichen Vorstellungen nicht Realität geworden und diese Arbeit nicht entstanden.

## 7. Tabellen und Abbildungen

### 7.1 Tabellen

Tabelle 1: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms nach [6,7].....	11
Tabelle 2: Grading nach Elston und Ellis [8,9]. Scoresystem zur histologischen Graduierung.....	12
Tabelle 3: Risikoeinschätzung nach molekularbiologischem Subtyp St. Gallen.....	14
Tabelle 4: Cytosolverdünnung in Abhängigkeit zur Tumoreinwaage.....	29
Tabelle 5: Plattenschema für uPA bzw. PAI-1.....	30
Tabelle 6: Berechnungsschema für das Aspirationsvolumen.....	34
Tabelle 7: Klinisch-pathologische Charakteristika der Studienpopulation.....	37

### 7.2 Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung uPA als Plasminogenaktivator.....	15
Abbildung 2: Hallmarks of Cancer (Hanahan und Weinberg 2016) [44].....	20
Abbildung 3: Emerging Hallmarks and Enabling Characteristics (Hanahan und Weinberg 2016) [44].....	21
Abbildung 4: Intrazelluläre Signalregulation der Krebszelle (Hanahan und Weinberg 2016) [44].....	22
Abbildung 5: Zellen der Tumormikroumgebung (Hanahan und Weinberg 2016) [44].....	23
Abbildung 6: Punktionsstellen zur Knochenmarkaspiration. Beide Beckenkämme wurden im Rahmen der Knochenmarkbiopsie punktiert.....	32
Abbildung 7: Positivfärbung von dCK+ Zellen (Antikörper: [Clone CK18 (Clone CK2), 1:100; Fa. Chemicon, Hofheim, Germany]).....	36
Abbildung 8: dCK + in Abhängigkeit vom PAI-1 bzw. uPA-Status.....	39
Abbildung 9: Überlebenszeit des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom uPA/PAI-1 Status.....	40
Abbildung 10: Überlebenszeit des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom Nachweis dCK+ im Knochenmark.....	41

Abbildung 11: Überlebenszeit des Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit vom uPA/PAI-1 Status.....	42
Abbildung 12: Überlebenszeit des Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit vom Nachweis dCK+ im Knochenmark.....	43
Abbildung 13: Überlebenszeit des N0-Kollektivs in Abhängigkeit vom uPA/PAI-1 Status.....	44
Abbildung 14: Überlebenszeit des N0-Kollektivs in Abhängigkeit vom Nachweis von dCK+ im Knochenmark.....	45
Abbildung 15: Überlebenszeit des N0-Kollektivs in Abhängigkeit vom PAI-1 Status, Double positivity (uPA+, PAI-1+) und Triple positivity (uPA+, PAI-1+, dCK+cells pos.).....	45
Abbildung 16: Überlebenszeit des N0-Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit vom uPA/PAI-1 Status.....	46
Abbildung 17: Überlebenszeit des N0-Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit vom Nachweis dCK+ im Knochenmark.....	47
Abbildung 18: Überlebenszeit des N0-Kollektivs ohne Chemotherapie in Abhängigkeit von Double positivity (uPA+, PAI-1+) und Triple positivity (uPA+, PAI-1+, dCK+cells pos.).....	47

## 8. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland für die Jahre 2013/2014. 11. überarbeitete Auflage. Berlin, 2017
2. Beckmann MW, Brucker C, Hanf V, Rauh C, Bani M, Knob S, Petsch S, Schick S, Fasching PA, Hartmann A, Lux M, Häberle L. Quality Assured Health Care in Certified Breast Centers and Improvement of the Prognosis of Breast Cancer Patients. *Onkologie* 2011; 34:362-367
3. Harbeck N, Würstlein R. Mammakarzinom Individualisierte Therapiekonzepte. *Internist* 2013; 54:194-200
4. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.). Pathologie. 5. Auflage. Urban & Fischer; München, 2012
5. Tavassoli A, Devilee P (Hrsg.). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon, 2003
6. Wittekind C, Meyer H, Bootz F (Hrsg.). TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage. Springer-Verlag; Berlin, 2003
7. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002; 20(17): 3628-3636
8. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19(5):403-10.
9. Tumorzentrum München (Hrsg.). Manual Mammakarzinome, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 16. Auflage. W. Zuckschwerdt Verlag; München, 2017
10. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from

- National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. J Clin Oncol. 1988; 6(7):1076-1087
11. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. Exp Cell Res. 2003; 284(1):99-110
  12. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Version 4.0, 2017 AWMF Registernummer: 032-045OL. Berlin, 2017
  13. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Version 3.0, 2012 AWMF Registernummer: 032-045OL. Berlin, 2012
  14. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. Breast Cancer Res Treat. 2015; 153(3):477-91
  15. Nitz U, Gluz O, Huober J, Kreipe HH, Kates RE, Hartmann A, Erber R, Scholz M, Lisboa B, Mohrmann S, Möbus V, Augustin D, Hoffmann G, Weiss E, Böhmer S, Kreienberg R, Du Bois A, Sattler D, Thomssen C, Kiechle M, Jänicke F, Wallwiener D, Harbeck N, Kuhn W. Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression. Annals of Oncology 2014; 25(8):1551-1557
  16. K. Mengele, Harbeck N, Reuning U, Magdolen V, Schmitt M. Tumorassoziierte Prognosefaktoren der Plasminogenaktivator-Familie. Bestimmung und klinische Wertigkeit von u-PA, t-PA, PAI-1 und PAI-2. Hämostaseologie 2005; 25:301-10
  17. Davidson JF, McNicol GP, Frank GL, Anderson TJ, Douglas AS. Plasminogen-activator-producing tumour. Br Med J. 1969; 1:88-91
  18. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. Thromb Haemost. 2004; 91:450-6
  19. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K,



- Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Bro  t P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Pooled analysis of prognostic impact urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(2):116-28
20. Mego M, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedlackova T, Tothova L, Vlkova B, Cierna Z, Janega P, Luha J, Gronesova P, Pindak D, Fridrichova I, Celec P, Reuben JM, Cristofanilli M, Mardiak J. Relationship between Circulating Tumor Cells, Blood Coagulation, and Urokinase-Plasminogen-Activator System in Early Breast Cancer Patients. *The Breast Journal* 2015; 21(2):155-160
  21. Su SC, Lin CW, Yang WE, Fan WL, Yang SF. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets.* 2016; 20(5): 551-566
  22. Duffy MJ. The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in malignancy. *Curr Pharm Des.* 2004; 10(1):39-49
  23. Durand MK, B  dker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, Kjelgaard S, Mathiasen L, Pedersen KE, Skeldal S, Wind T, Andreassen PA. Plasminogen activator inhibitor-I and tumour growth, invasion, and metastasis. *Thromb Haemost.* 2004; 91(3): 438-49
  24. Fang H, Placencio VR, DeClerck YA. Protumorigenic Activity of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Through an antiapoptotic Function. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104(19):1470-1484
  25. Placencio VR, DeClerck YA. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing. *Cancer Res.* 2015; 75(15): 2969-74
  26. Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep CG, Lisboa BW, Lux MP, Beck T, Hasmmuller S, Kiechle M, Janicke F, Thomssen C. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *European Journal of Cancer* 2013; 49:1825-1835

27. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JGM, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type Plasminogen Activator (upA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *Cancer Res* 2002; 62: 4617-4622
28. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, Hammond EH, Kuderer NM, Liu MC, Mennel RG, Van Poznak C, Bast RC, Hayes DF. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol.* 2016; 34:1134-1150
29. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich C, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. Cytokeratin-Positive Cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2000; 342: 525-533
30. Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Juckstock J, Borgen E, Rack B, Braun S, Sommer H, Solomayer E, Pantel K, Nesland J, Friese K, Naume B. Persistence of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Breast Cancer Patients Predicts Increased Risk for Relapse – A European Pooled Analysis. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(9):2967-2976
31. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of the bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353:793-802
32. AGO Breast Committee Breast Care 2017 (Hrsg.): Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Recommendations 2017. [www.ago-online.de](http://www.ago-online.de)
33. Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, Harris JR, Khan SA, Horton J, Klimberg S, Chavez-MacGregor M, Freedman G, Houssami N, Johnson PL, Morrow M. SSO-ASTRO Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery with Whole Breast Irradiation in Stage I and II Invasive Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014; 88(3):553-564

34. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347(16): 1227-32.
35. New Zealand Guidelines Group (Hrsg.): Management of early breast cancer. Wellington: New Zealand Guidelines Group. Wellington, 2009.
36. Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL, Benson AB III, Bosserman LD, Burstein HJ, Cody H III, Hayman J, Perkins CL, Podoloff DA, Giuliano AE. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2014; 32(13):1365-1383
37. Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, Scholl S, Makris A, Valagussa P, Blohmer JU, Eiermann W, Jackesz R, Jonat W, Lebeau A, Loibl S, Miller W, Seeber S, Semiglazov V, Smith R, Souchon R, Stearns V, Untch M, von Minckwitz G. Recommendations From an International Expert Panel on the Use of Neoadjuvant (Primary) Systemic Treatment of Operable Breast Cancer: An Update. *J Clin Oncol*. 2006; 24(12):1940-1949
38. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011; 378(9793):771-84.
39. Eisen A, Fletcher GG, Gandhi S, Mates M, Freedman OC, Dent SF, Trudeau ME. Optimal Systemic Therapy for Early Female Breast Cancer. Evidence-based series. *Curr Oncol*. 2015; 22:67-81
40. Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhardt MJ, de Azabuja E, Procter M, Suter TM, Jackisch C, Cameron D, Weber HA, Heinzmann D, Dal Lago L, McFadden E, Dowsett M, Untch M, Gianni L, Bell R, Köhne CH, Vindevoghel A, Andersson M, Brunt AM, Otero-Reyes D, Song S, Smith I, Leyland-Jones B, Baselga J. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2017; 382(9897):1021-1028
41. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C,

- Wang Y. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials: *Lancet* 2005; 366(9503):2087-2106.
42. Corradini S, Niyazi M, Niemoeller OM, Li M, Roeder F, Eckel R, Schubert-Fritschle G, Scheithauer HR, Harbeck N, Engel J, Belka C. Adjuvant radiotherapy after breast conserving surgery – a comparative effectiveness research study. *Radiother Oncol.* 2015; 114(1):28-34
  43. EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group), McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, Ewertz M, Gray R, Mannu G, Peto R, Whelan T, Wang Y, Wang Z, Darby S. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet* 2014; 383(9935):2127-2135
  44. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674
  45. Janni W, Pantel K, Rack B, Schindlbeck C, Sommer H, Gerber B, Friese K. Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen. *Deutsches Ärzteblatt* 2004; 101(51-52):3496-3502
  46. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J. Hematother.* 1994; 3:165-173.
  47. Borgen E, Pantel K, Schlimok G, Müller P, Otte M, Renolen A, Ehnle S, Coith C, Nesland JM, Naume B. A European Interlaboratory Testing of Three Well-Known Procedures for Immunocytochemical Detection of Epithelial Cells in Bone Marrow. Results from Analysis of Normal Bone Marrow. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006; 70(6):400-409
  48. Choesmel V, Pierga JY, Nos C, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Thiery JP, Blin N. Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. *Breast Cancer Res.* 2004; 6:556-569
  49. Thiery HP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 2009; 139(5):871-890

50. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncology* 2004; 5:79-88
51. Gilje B, Nordgård O, Tjensvoll K, Borgen E, Synnøstvedt M, Smaaland R, Naume B. Comparison of molecular and immunocytochemical methods for detection of disseminated tumor cells in bone marrow from early breast cancer patients. *BMC Cancer* 2014; 14: 514
52. Forus A, Høifødt HK, Øverli GET, Myklebost O, Fodstad Ø. Sensitive fluorescent in situ hybridisation method for the characterisation of breast cancer cells in bone marrow aspirates. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 1999; 52(2):68-74
53. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(3):920-928
54. Bidard FC, Proudhon C, Pierga JY. (2016). Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol Oncol.* 2016; 10(3):418-430
55. Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M, Hahn M, Becker S, Solomayer EF, Brucker SY, Fehm TN, Wallwiener D. Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients – Results from a large single-centre analysis. *Eur J Cancer.* 2014; 50(15):2550-2559
56. Franzén B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Uruy K, Hirano T, Okuzawa K, Auer G. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins. *British Journal of Cancer* 1996; 73: 1632-1638
57. Sweep CGJ, Geurts-Moespot J, Grebenschikov N, de Witte JH, Heuvel JJTM, Schmitt M, Duffy MJ, Jänicke F, Kramer MD, Foekens JA, Brunner N, Brugal G, Pedersen AN, Benraad ThJ. External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *British Journal of Cancer* 1998; 78(11):1434-1441

58. Benraad TJ, Geurts-Moespot J, Grøndahl-Hansen J, Schmitt M, Heuvel JJ, de Witte JH, Foekens JA, Leake RE, Brünner N, Sweep CG. Immunoassays (ELISA) of urokinase-type plasminogen activator (uPA): report of an EORTC/BIOMED-1 workshop. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(8):1371-1381
59. Jänicke F, Pache L, Schmitt M, Ulm K, Thomssen C, Prechtel A, Graeff H. Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissue are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1. *Cancer Res*. 1994; 54:2527-2530
60. Schmitt M, Mengele K, Gkazepis A, Napieralski R, Magdolen V, Reuning U, Harbeck N. Assessment of Urokinase-Type Plasminogen Activator and its Inhibitor PAI-1 in Breast Cancer Tissue: Historical Aspects and Future Prospects. *Breast Care* 2008; 3(s2):3-10
61. Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar SM, Fuster C, Aznar J. Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Urokinase Plasminogen Activator, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1, and Tissue Metalloproteinase Inhibitor Type 1 Gene Expressions in Primary Breast Cancer. *Clinical Chemistry* 2002; 48(8):1288-1295
62. Biermann JC, Holzschreiter L, Kotzsch M, Luther T, Kiechle-Bahat M, Sweep FC, Span PN, Schmitt M, Magdolen V. Quantitative RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: Comparison to antigen quantification by ELISA. *Int J Mol Med*. 2008; 21(2):251-259
63. Spyratos F, Bouchet C, Tozlu S, Labroquere M, Vignaud S, Becette V, Lidereau R, Bieche I. Prognostic value of uPA, PAI-1 and PAI-2 mRNA expression in primary breast cancer. *Anticancer Res*. 2002; 22(5):2997-3003
64. Nagamine Y, Medcalf RL, Muñoz-Cánoves P. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost*. 2005; 93(4):661-675
65. Ferrier CM, de Witte HH, Straatman H, van Tienoven DH, van Geloof WL, Rietveld FJR, Sweep CGJ, Ruiter DJ, van Muijen GNP. Comparison of immunohistochemistry with immunoassay (ELISA) for the detection of

- components of the plasminogen activation system in human tumour tissue. *British Journal of Cancer* 1999; 79(9-10):1534–1541
66. Jänicke F, Schmitt M, Hafter R, Hollrieder A, Babic R, Ulm K, Gössner W, Graeff H. Urokinase-type plasminogen activator (u-PA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 1990; 4:69-78
  67. Thomas C, Wiesner C, Melchior SW, Schmidt F, Gillitzer R, Thüroff JW, Pfitzenmaier J. Urokinase-plasminogen-activator receptor expression in disseminated tumour cells in the bone marrow and peripheral blood of patients with clinically localized prostate cancer. *BJU Int.* 2009; 104(1):29-34
  68. Whitley BR, Palmieri D, Twerdi CD, Church FC. Expression of active plasminogen activator inhibitor-1 reduces cell migration and invasion in breast and gynecological cancer cells. *Exp Cell Res.* 2004; 296(2):151-162.
  69. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, Datar RH, Cote RJ. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(19):5615-5621
  70. Kolben T, Augustin D, Armbrust R, Kolben TM, Degenhardt T, Burgmann M, Goess C, Ditsch N, Kates R, Harbeck N, Wuerstlein R. Impact of guideline-based use of uPA/PAI-1 on patient outcome in intermediate-risk early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 155(1):109-115
  71. Kwaan HC, McMahon B. The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res.* 2009; 148:43-66
  72. Palumbo JS, Degen JL. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor metastasis. *Thromb Res.* 2007; 120(2):22-28
  73. Giordano A, Gao H, Cohen EN, Anfossi S, Khoury J, Hess K, Krishnamurthy S, Tin S, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Woodward WA, Lucci A, Reuben JM. Clinical relevance of cancer stem cells in bone marrow of early breast cancer patients. *Annals of Oncology* 2013; 24(10):2515-2521

## **Eidesstattliche Versicherung**

**Kazik, Martin Franz**

---

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

### **Prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und uPA/PAI-1 beim Mammakarzinom**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, den 04.02.2019  
Ort, Datum

---

Martin Franz Kazik  
Unterschrift Doktorand